ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 N° 70

LA GLYCOLYSE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE

Rôle et mise en évidence de la succinodeshydrogénase

THÈSE

pour le Doctorat Vétérinaire
Diplôme d'État

présentée et soutenue publiquement en juin 1972
devant l'UNIVERSITE PAUL-SABATIER de TOULOUSE

par

MALITTE Alain, Henri, Claude
Né le 2 avril 1945 à Brive-la-Gaillarde (Corrèze)

Jury :

Président : MM. GUILHEM, Professeur de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : VAN HAVERBEKE, Prof. de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
CABANIÉ, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

CEPADUES
29, boul. Carnot, 29
TOULOUSE

LA GLYCOLYSE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE

Rôle et mise en évidence de la succinodeshydrogénase

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1972 N° 70

LA GLYCOLYSE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE

Rôle et mise en évidence de la succinodeshydrogénase

THÈSE

pour le Doctorat Vétérinaire
Diplôme d'État

présentée et soutenue publiquement en juin 1972
devant l'UNIVERSITE PAUL-SABATIER de TOULOUSE

par

MALITTE Alain, Henri, Claude
Né le 2 avril 1945 à Brive-la Gaillarde (Corrèze)

Jury :

Président : MM. GUILHEM, Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

Assesseurs : VAN HAVERBEKE, Prof. à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
CABANIÉ, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

CEPADUES
29, boul. Carnot, 29
TOULOUSE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. FLORIO
Directeurs Honoraires : MM. PONS, DARRASPEN — Professeur Honoraire : M. LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire		M. GODFRAIN
Maître-Assistant	Pharmacie et Toxicologie	Mme BURGAT-SACAZE

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire	M. RICO
Physique biologique et médicale	
Chimie biologique et médicale	

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire	M. PAVAUX
Anatomie descriptive - Extérieur	
Anatomie appliquée - Tératologie	

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire	M. RUCKEBUSCH
Maître de Conférences, non Chef de Service	M. FARGEAS
Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie	

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titualire	M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans Chaire	M. CABANIE
Maître-Assistant	M. MAGNOL
Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique	

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire	M. LABIE
Maître-Assistant	M. EECKHOUTTE
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale	

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire	M. BRIZARD
Maître-Assistant Agrégé	M. DORCHIES
Zoologie appliquée - Parasitologie externe	
Parasitologie interne - Clinique	

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire	M. FLORIO
Professeur sans Chaire	M. LESCURE
Maître-Assistant	M. GUELFI
Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores	
Législation Vétérinaire et déontologie - clinique	

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire	M. TOURNUT
Professeur sans Chaire	M. ESPINASSE
Maître-Assistant	M. BEZILLE
Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de Basse-Cour - Clinique	
Clinique ambulatoire	

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire	M. CAZIEUX
Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale Technique Chirurgicale - Pathologie Chirurgicale	

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire	M. BERTHELON
Professeur sans Chaire	M. ROYAL
Sémiologie et propédeutique - Pathologie de la Reproduction Obstétrique - Clinique	

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire	M. SAURAT
Maître-Assistant Agrégé	M. CHANTAL
Maladies Contagieuses - Zoonoses Législation Sanitaire	

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire	M. LAUTIE
Maître-Assistant	M. MEIGNIER
Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale	

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire	M. QUEINNEC
Maître-Assistant	M. DARRE
Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène Générale - Zootechnie - Elevage - Economie Générale et des productions animales	

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire	M. FALIU
Maître de Conférences, non chef de Service	M. GRIESS
Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie Alimentation	

COURS COMPLEMENTAIRES - CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies Infectieuses	M. MONNIER
Aspect médical des Zoonoses	M. ARMENGAUD
Energétique	M. LABOUCHE
Initiation à l'Informatique Biomédicale	M. FERNET
Agronomie	M. COMBRET
Métabolismes	M. RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891, et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

A MES PARENTS,

En témoignage de ma profonde affection.

A MA FEMME,

A MES BEAUX-PARENTS,

A TOUTE MA FAMILLE,

A TOUS MES AMIS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILHEM

de l'Université Paul Sabatier

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. VAN HAVERBEKE,
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a accueilli dans son Service et toujours entouré d'une grande sollicitude.

Que ce travail soit l'occasion de vous témoigner notre reconnaissance et notre respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CABANIE,
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a constamment guidé dans l'élaboration de ce travail.

Profonds remerciements.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR Ch. LABIE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur de
nous accepter dans son Service.

Témoignage de notre gratitude.

A TOUS NOS MAITRES,

A qui nous devons tant,

Hommage de notre reconnaissance.

A TOUS CEUX QUI ONT COLLABORE A L'édification de ce travail.

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE I : VUE D'ENSEMBLE DE LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE

A) RAPPELS DE STRUCTURE

1°) Structure générale de la fibre
2°) Le sarcolemme et le système T
3°) Le sarcoplasme
4°) Les noyaux et les formations paranucléaires
5°) Le chondriome
6°) Le reticulum sarcoplasmique
7°) Les myofibrilles

B) BIOCHIMIE MOLECULAIRE DE LA FIBRE

1°) Les matières minérales
2°) Les glucides du muscle
3°) Les protéines non contractiles
4°) Les protéines contractiles

C) DONNEES RELATIVES A LA CONTRACTION MUSCULAIRE

CHAPITRE II : LA CLYCOLYSE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE

A) LA GLYCOGENOLYSE

B) LA GLYCOLYSE PROPREMENT DITE (et ses débouchés)

1°) La glycolyse anaérobie

. la fermentation lactique

2°) La glycolyse aérobie

. le cycle de Krebs

. les oxydo-réductions et les phosphorylations de la chaîne respiratoire

3°) Le bilan de la glycolyse musculaire

4°) Autres voies de dégradation du glucose

5°) Régulation de la glycolyse

C) LA NOTION DE TYPE DE FIBRES MUSCULAIRES STRIEES

1°) Les critères de différenciation (des fibres)

2°) Les fibres rouges

3°) Les fibres blanches

4°) Les fibres intermédiaires

5°) Signification de l'hétérogénéité des fibres.

CHAPITRE III : ETUDE DE LA LOCALISATION D'UNE ENZYME SPECIFIQUE DE LA MITOCHONDRIE : LA S.D.H.

A) PRINCIPE ET CHOIX D'UNE ENZYME

1°) Principe

2°) Choix d'une enzyme

B) TECHNIQUES DE LOCALISATION DE LA S.D.H.

1°) Principes généraux

2°) Etude critique des différentes techniques (7-32)

3°) Choix d'une technique

C) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1°) Prélèvement des échantillons de muscles

2°) Congélation des échantillons

3°) Mise en évidence de l'activité succinodéshydrogénasique

D) RESULTATS : ETUDE DE LA REPARTITION DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES DANS LE MUSCLE JUMEAU DU BOVIN

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Le cycle de l'activité de la fibre musculaire striée squelettique : excitation, contraction, relaxation représente un ensemble de réactions cellulaires extrêmement complexe.

Ces modifications biochimiques et structurales de la fibre ont fait, depuis longtemps, l'objet de nombreuses études qui ont pris un essor considérable avec le développement de la microscopie électronique et des techniques cytochimiques précises.

Nous nous sommes intéressés, dans ce travail, à la partie de la biochimie musculaire qui concerne les sources d'énergie des fibres, et, en particulier, le mécanisme fondamental de la glycolyse.

Pour ce faire, nous avons suivi la dégradation du glycogène et ses rapports avec les principaux organites cellulaires.

Nous envisagerons dans la première partie de cet exposé, des rappels de structure et d'ultrastructure de la fibre musculaire striée squelettique, indispensables pour situer le déroulement de la glycolyse qui sera développée dans la deuxième partie.

La troisième partie sera consacrée à l'étude de la localisation d'une enzyme du catabolisme glucidique : la succino-déshydrogénase ou SDH qui servira à analyser la répartition des fibres dans une masse musculaire.

CHAPITRE PREMIER

VUE D'ENSEMBLE DE LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE

Après l'étude sommaire de la structure générale de la fibre, nous envisagerons ses principaux éléments en insistant sur ceux qui interviennent particulièrement dans le métabolisme énergétique. Des notions de biochimie musculaire termineront ce chapitre.

A - RAPPELS DE STRUCTURE

Macroscopiquement, le tissu musculaire strié squelettique se présente sous forme de masses séparées et reliées entre elles par une formation conjonctive particulière : le périmysium qui individualise chaque muscle. Une section musculaire examinée à un faible grossissement révèle que ces masses, de volume variable, sont elles-mêmes divisées vers l'intérieur par d'autres membranes conjonctives : l'endomysium où circulent les vaisseaux et les nerfs du muscle et qui délimite les loges musculaires. Ces dernières sont également appelées faisceaux primaires, leur réunion formant des faisceaux secondaires.

Le contenu de ces loges, dilacéré dans l'alcool révèle qu'elles sont formées d'un grand nombre d'unités fonctionnelles: les fibres ou cellules musculaires.

1° - Structure générale de la fibre

Examinées à un faible grossissement, les fibres apparaissent comme de longues baguettes plus ou moins cylindriques. Elles ont une structure uniforme sur toute leur longueur qui peut varier de 1 à 40 mm pour une section comprise entre 10 et 100 µ (5).

L'examen à un grandissement supérieur, de coupes longitudinales et transversales, d'une de ces fibres, permet de voir que la cellule musculaire striée squelettique est, en fait, un plasmode plurinucléé. Elle comprend d'une part les constituants cellulaires dits classiques parmi lesquels se placent :

- la membrane plasmique appelée sarcolemme qui limite la fibre et qui est doublée d'une basale d'épaisseur variable

- un système tubulaire transverse (Système T) ouvert sur le sarcolemme

- le cytoplasme ou milieu fondamental cellulaire appelé sarcoplasme. Sa richesse en une protéine spécifique du muscle : la myoglobine, lui donne sa couleur rouge

- des noyaux nombreux et répartis à la périphérie de la fibre

- un appareil de Golgi

- un chondriome abondant et prenant diverses dispositions

- un reticulum sarcoplasmique développé qui joue un grand rôle dans les mouvements ioniques cellulaires. Il est également en rapport avec le système tubulaire transverse dans des formations particulières appelées triades. (schéma n° 1).

D'autre part, cette cellule renferme des éléments particuliers : les myofibrilles. Ce sont des organites qui, en définitive, transforment l'énergie chimique en mouvement et confèrent à la fibre sa

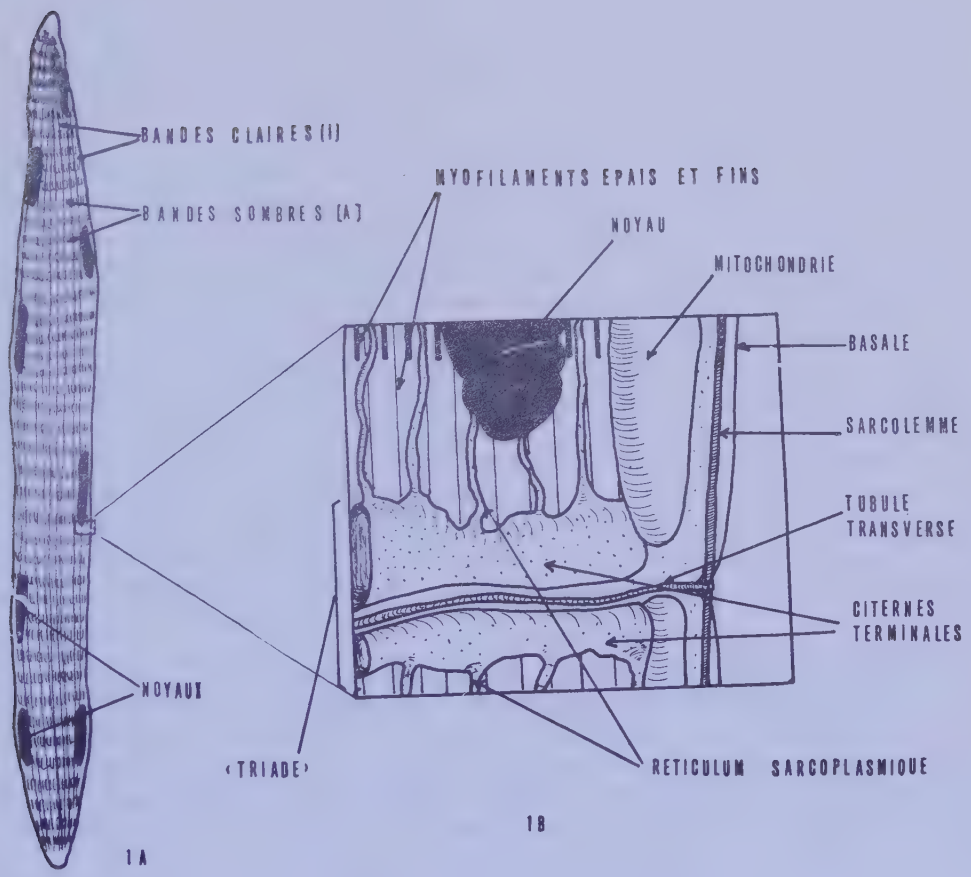


Schéma 1.

1 A. - Vue d'ensemble de la fibre montrant sa double striation et ses noyaux périphériques.

1 B. - Vue à un grandissement supérieur mettant en évidence les principaux organites de la fibre. Le tubule transverse du système T masque la strie Z. Il est situé entre deux citernes terminales du reticulum sarcoplasmique formant ainsi une triade. Le noyau dont on voit l'extrémité est spiralé. Les myofilaments sont disposés parallèlement au grand axe de la fibre.

haute spécialisation. Ces myofibrilles qui sont groupées en colonnettes parallèles dans toute la longueur de la fibre musculaire sont formées d'une succession de bandes claires et sombres alternées. C'est leur disposition extrêmement régulière qui donne l'aspect strié à la fibre. En lumière polarisée, les bandes claires sont isotropes d'où leur nom de bandes ou disques I ; les bandes sombres sont, au contraire, anisotropes, ce sont les bandes A. Chaque disque clair présente en son milieu une ligne plus sombre, la strie Z. Deux stries Z successives délimitent un sarcomère qui est l'unité fondamentale de la myofibrille. Très souvent, on peut reconnaître, au milieu du disque A, une zone claire : la zone H de Hensen, divisée elle-même par la strie M plus sombre. Il est à noter que la quantité de myofibrilles contenue dans la fibre musculaire est dans un rapport inverse avec la quantité de sarcoplasme. Cette observation avait conduit, depuis longtemps, certains auteurs à penser que les fibres musculaires squelettiques n'avaient pas la même structure. Ils distinguaient les fibres rouges, riches en sarcoplasme et pauvres en myofibrilles et les fibres blanches pauvres en sarcoplasme et riches en myofibrilles. A l'heure actuelle, la notion de type est beaucoup plus complexe. Son étude sera développée à la fin de ce travail.

L'utilisation de la microscopie électronique s'avère indispensable dans l'étude des structures membranaires de la cellule. Employée avec les méthodes de localisation cytochimique fine, elle a permis de progresser considérablement dans la connaissance des phénomènes liés à l'activité musculaire.

2° - Le sarcolemme et le système T

Le sarcolemme limite la fibre extérieurement. Son épaisseur moyenne est de 70 - 75 Å. Il est lui-même revêtu plus ou moins complètement par la membrane basale dont l'épaisseur est très variable allant de 1 000 Å par endroits pour disparaître à d'autres. Elle semble adhérer assez peu au sarcolemme puisqu'elle n'en suit pas

les rides qu'il peut présenter, ni les replis longitudinaux ou transversaux au niveau de la strie Z (sauf de rares cas où la pénétration est très faible) (49 bis). Sous le sarcolemme sont alignées des sortes de vacuoles en regard de la strie Z ou des jonctions de bandes A et I ; elles ressemblent à des microvésicules de pinocytose et sont analogues aux "caveolae intra-cellulares" décrites par YAMADA (1955) cité par ISHIKAWA (22). En réalité, ces vésicules représentent une partie du système T (49). Il a été montré que des canalicules les reliaient au sarcolemme dont elles ne seraient qu'une invagination. Ces tubules dont le diamètre moyen varie de 300 à 500 A sont ouverts à l'extérieur par des pores du sarcolemme dans la zone de la strie Z. Ils sont disposés transversalement au grand axe de la fibre. Leurs renflements qui apparaissent comme des vacuoles sur les coupes sont dans la plupart des cas reliés entre eux par d'autres tubules de diamètre plus faible.

Des travaux récents, en accord avec des observations antérieures (49) présentent le système T comme un réseau de tubules régulièrement disposés selon un mode hexagonal ou parfois tétragonal (22-23).

L'origine de ce système T a suscité pendant longtemps de nombreuses controverses. Dans la fibre musculaire en formation, il se développe parallèlement au reticulum sarcoplasmique avec lequel il est en contact très étroit surtout dans des formations particulières appelées triades. Deux origines étaient proposées : l'une sarcolemmique, l'autre réticulaire. En fait, une série de travaux réalisés tant sur la fibre musculaire adulte que sur la fibre en formation semble bien démontrer, à l'heure actuelle, que le système T est de nature sarcolemmique. La localisation du sodium libre dans la fibre squelettique (60) par la méthode des précipités au pyroantimoniate de potassium après fixation au tétroxyde d'osmium montre une grande quantité de précipités dans la région sarcolemmique et dans le système T, alors que le reste

de la fibre en est dépourvu y compris le reticulum sarcoplasmique. Les microanalyses ont confirmé ce fait. L'imprégnation des fibres en formation par la ferritine (9) a également mis en évidence la continuité entre le milieu extracellulaire et l'ébauche du système T uniquement. De plus, ces invaginations plus ou moins vésiculées observées dans la fibre en formation sont limitées par des membranes présentant la même structure asymétrique que celle des systèmes T nettement différentiés. Elles sont formées de trois couches superposées d'épaisseur totale égale à 80-90 Å (18).

Le rôle très important du système T dans la contraction musculaire a été souligné par des travaux (25-30) concernant la transmission du potentiel d'action. Lorsque l'on dépolarise de petites parties de la surface de la fibre (25) cela ne conduit à une contraction localisée que si l'onde dépolarisante est appliquée à proximité de la triade. De plus, il a été montré que la détérioration du système T par une solution de glycérol entraînait l'apparition d'une inertie totale de la fibre soumise à des potentiels d'action.

3° - Le sarcoplasme

Milieu fondamental de la fibre musculaire, il solidarise tous les organites cellulaires. Il contient de nombreuses substances en solution tels que des sels, des protéines comme l'A.T.P., le phosphagène, la myoglobine qui lui donne sa couleur rouge.

Des substances existent à l'état granulaire avec, en particulier, les agrégats de ribosomes réunis par de fins filaments protéiques et morphologiquement semblables aux polysomes (19-11) trouvés dans les fibres musculaires jeunes. Des gouttelettes lipidiques sont également mises en évidence dans la zone de la bande I où elles sont disposées en rangées entre les myofibrilles (35). Des lysosomes sont aussi rencontrés sous forme de vésicules. Les grains de glycogène présents dans le sarcoplasme en grand nombre, représentent la réserve d'énergie du muscle (50 % du glycogène total).

4° - Les noyaux et les formations paranucléaires

Les noyaux de la fibre musculaire striée squelettique sont distribués dans la grande majorité des cas en position sous-sarcolemmique. La centralisation d'un noyau ne s'observe que sur 1 % des fibres environ.

Des observations portant sur des cellules jeunes (20) ont montré la présence de plages denses de glycogène autour du noyau dont la membrane s'évaginait dans la masse glycogénique.

Les noyaux de la fibre adulte contiennent, en général, un ou deux nucléoles et dans 90 % des cas possèdent une forme allongée dans le sens de la fibre, aplatie avec un degré de spiralisation variable. Leur longueur varie de 11 à 18 µ pour une largeur de 4 à 7 µ et une épaisseur de 1 à 2 µ (13). C'est en position juxtanucléaire que se trouve l'appareil de Golgi. Il est relativement réduit et se compose de quelques saccules fins empilés et de quelques grains de sécrétion.

5° - Le chondriome

Il revêt dans la fibre musculaire striée une importance particulière liée à l'activité métabolique de celle-ci. En effet, il a été montré que plus les mitochondries sont nombreuses, plus l'activité de la fibre est grande. Elles sont distribuées soit en position sous-sarcolemmique où elles sont généralement grosses, de formes plus ou moins sphériques et groupées en amas, soit entre les myofibrilles où quelques formes sphériques sont réparties entre d'autres mitochondries d'aspect filamenteux et plus petites.

Dans ce dernier cas, elles sont souvent groupées en chaînes de part et d'autre des stries Z. Il existe d'autres variations morphologiques intervenant dans la distinction entre les fibres blanches et les fibres rouges.

Dans ces dernières, les mitochondries, plus nombreuses et plus volumineuses, adoptent des formes particulières, surtout au niveau de la bande I. Elles émettent des prolongements encerclant les myofibrilles des deux côtés de la strie Z (14).

Des colorations au Soudan Noir ont mis en évidence des gouttelettes lipidiques de triglycérides très nombreuses au contact des mitochondries. Ces gouttelettes qui sont pratiquement inexistantes dans les fibres blanches (14) interviendraient dans le métabolisme énergétique (15).

L'étude de la structure des mitochondries montre une membrane continue formée de deux feuillets, limitant une substance fondamentale appelée matrice. Le feuillet interne augmente la surface membranaire par le développement de nombreux replis ou crêtes mitochondriales. Leur taille peut varier de celle d'une petite élevure à la formation d'un tube continu entre les parois de la mitochondrie. Dans certains cas, la matrice est extrêmement réduite, à cause du nombre et de la taille des crêtes très serrées les unes contre les autres.

Les rôles du chondriome dans la fibre musculaire sont variés. La mitochondrie a souvent été définie comme le centre des oxydations cellulaires et elle est, en effet, le siège de la transformation de l'énergie d'oxydoréduction en A.T.P. à partir d'A.D.P. Il faut noter cependant que des différences importantes peuvent intervenir dans l'équipement en enzymes oxydatives situées sur les crêtes mitochondriales. Le cas a été observé pour certaines déshydrogénases sans que l'on puisse en donner une explication (37). Il est vraisemblable que les phosphorylations intramitochondriales mettent en jeu plusieurs systèmes enzymatiques. C'est ce qui ressort d'observations faites sur des mitochondries fragmentées.

Les fragments isolés ne sont pas capables de catalyser les phosphorylations alors que leur association peut les réaliser. De plus, certaines de ces fractions

peuvent hydrolyser l'A.T.P. en A.D.P. alors que d'autres sont capables de leur redonner la possibilité de synthétiser l'A.T.P. La mitochondrie est normalement imperméable à de nombreuses substances des séquences métaboliques qui s'y déroulent ; des substrats intermédiaires tel que l'α-glycérophosphate sont nécessaires à l'enchaînement de ces séquences entre le sarcoplasme et les membranes mitochondriales. Certains traitements tels que les ultra-sons ou des bains dans des solutions hyper ou hypotoniques peuvent multiplier par 100 et plus la perméabilité de la mitochondrie vis-à-vis de substrats tels que le N.A.D. réduit ou l'isocitrate. Ceci pourrait expliquer l'origine des cas de solution de continuité de la membrane mitochondriale relevés par certains auteurs.

Les mitochondries jouent également un rôle important dans les migrations ioniques intracellulaires et, en particulier, en ce qui concerne celles du calcium, élément essentiel dans le déclenchement et l'arrêt des cycles contraction-relaxation de la fibre musculaire.

Cette participation au contrôle des concentrations en ions calciques du sarcoplasme est vraisemblablement en rapport avec l'union intime des mitochondries et des citernes terminales du reticulum sarcoplasmique dans la zone des triades (14).

Des études ont également révélé la présence de nombreuses mitochondries à la jonction neuro-musculaire. Elles sont groupées en agrégats entre les replis faisant suite aux terminaisons axoniques (38). D'autres travaux (53) confirmant ces faits, ont montré que des mitochondries sont également en rapport très étroit avec les vésicules terminales, les plus petites d'entre elles étant réunies à la membrane mitochondriale par des tubules dont la longueur varie de 200 à 800 Å pour une section de l'ordre de 250 Å. Il faut noter que ces derniers organites appartiennent en fait à la cellule nerveuse.

Le chondriome de la cellule musculaire semble donc intervenir aux trois phases de la contraction

musculaire : la transmission neuromusculaire de l'influx, le développement de la contraction par l'intermédiaire des ions calciques, la production d'énergie grâce à ses systèmes enzymatiques qui vont dégrader en présence d'oxygène les acides tricarboxyliques provenant de la glycolyse extramitochondriale.

6° - *Le reticulum sarcoplasmique*

Le reticulum sarcoplasmique qui a toujours un grand développement dans les fibres musculaires se présente sous l'aspect d'un réseau de tubules longitudinaux débouchant dans des cavités anastomosées entre elles et orientées transversalement.

Cet ensemble de tubules encercle et sépare les myofibrilles contre lesquelles il est accolé.

Les cavités anastomosées, de forme irrégulière, constituent à chaque extrémité du sarcomère, les citernes terminales, parallèles à la strie Z. Au centre du sarcomère, une disposition analogue en anneaux plus ou moins réguliers (14) est formée par la confluence des tubules longitudinaux. Dans certains cas, des prolongements perpendiculaires à ces tubules peuvent pénétrer la masse myofibrillaire.

Les membranes limitant le reticulum sarcoplasmique de la fibre adulte sont lisses et présentent une structure asymétrique composée de trois couches dont l'épaisseur totale est de 60 Å.

La couche externe est plus dense et plus épaisse que la partie en regard de la lumière des tubules (18).

La structure granulaire du reticulum endoplasmique classique avec les ribosomes accolés à la membrane se retrouve dans les fibres embyonnaires. Au fur et à mesure du développement de celles-ci, les ribosomes se détachent et migrent dans le sarcoplasme où vont se former les myofibrilles (19) laissant apparaître la membrane lisse du reticulum sarcoplasmique.

Au niveau de la strie Z, les citernes terminales de deux sarcomères voisins sont séparées par le tubule transversal du système T. De nombreuses observations ont rapporté que la distance séparant ces trois éléments était remarquablement constante et très petite, de l'ordre de 100 Å (57-58). Cette formation nettement définie, comprenant deux citernes terminales de deux sarcomères voisins et le tubule transverse du système T, porte le nom de triade (40).

La régularité de l'espace de 100 Å entre ces trois éléments semble assurée par la présence de cloisons ou de colonnettes qui unissent les membranes voisines deux à deux. A intervalles réguliers, les citernes terminales présentent des sortes de replis qui les mettent en contact plus étroit avec les tubules du système T sans qu'aucune continuité directe n'ait, cependant, été observée (26).

Le rôle du reticulum sarcoplasmique a été mis en évidence par divers travaux montrant son ingérence tant dans les métabolismes protéique et énergétique que dans les mouvements calciques intracellulaires.

Les ribosomes qui se détachent du reticulum sarcoplasmique au cours de la myogenèse sont étroitement associés à la formation des myofibrilles (3-19).

D'autres études ont révélé une activité ATPase sur la membrane réticulaire (43-31-48) ainsi que de nombreuses autres activités enzymatiques nécessaires au déroulement de la glycolyse (10).

Ces faits sont en accord avec des observations qui ont montré que les membranes cellulaires isolées sont capables de réaliser toutes les séquences de la glycolyse sans aucun apport enzymatique extérieur. [Green cité par Florkin (12].

Le glycogène, substrat énergétique de base de la fibre musculaire, est situé en premier lieu contre le reticulum sarcoplasmique qui le sollicite selon les besoins de la cellule en énergie (20).

Au cours de la contraction musculaire, le sarcoplasme est relativement riche en ions calciques alors que pendant la phase de repos, la grande majorité de ces ions est concentrée dans le reticulum sarcoplasmique (51-58). C'est ce phénomène qui est appelé "pompe calcique", celle-ci étant localisée sur la membrane du reticulum (8). Son siège serait pour certains auteurs les sites ATPase de la membrane réticulaire (43) alors que pour d'autres, il existerait des sites ATPase sans relation avec la pompe calcique (18).

7° - Les myofibrilles

Ce sont les éléments caractéristiques de la cellule musculaire. Leur disposition régulière est à l'origine de l'aspect strié de la fibre squelettique. La striation longitudinale est due à l'arrangement parallèle des myofibrilles d'une extrémité à l'autre de la fibre et la striation transversale est due à l'empilement régulier de sarcomères. Les myofibrilles, dont le diamètre est voisin de 1µ, sont groupées en champs dits "champs de Conheim".

Des études de ces sarcomères, en microscopie électronique (52) ont montré qu'ils étaient constitués de deux sortes de myofilaments, les filaments épais ou primaires et les filaments fins ou secondaires, disposés longitudinalement selon un mode hexagonal double, combinant les deux types (28).

Les filaments épais d'un diamètre de 120 Å pour une longueur de 1,5 à 1,6 µ sont localisés dans la bande A. La distance séparant deux filaments épais voisins est d'environ 400 Å. Des observations aux rayons X ont montré que cet espace est une fonction inverse de la longueur du sarcomère et peut varier de 350 A à 600 Å (6).

Les filaments fins ont une section de 60 Å environ et une longueur de 1µ. L'arrangement hexagonal qu'ils forment également est centré sur un filament épais.

Ces filaments fins, réunis au niveau de la strie Z traversent la bande I pour pénétrer plus ou moins loin dans la bande A.

Dans la zone d'interpénétration des deux types de filaments, sont disposés des ponts tous les 60 A environ, en progression hélicoïdale de 60° autour des filaments épais et qui les relient aux six filaments fins voisins. Ces ponts n'existent plus au milieu de la bande A (strie M) où ils seraient remplacés par d'autres unissant un filament épais central à ses six voisins.

La strie Z, dont la structure fine est encore mal connue serait formée par l'entrecroisement de boucles des filaments fins des sarcomères contigus.

Ce mode de liaisons par boucles serait général dans la cellule musculaire et intéresserait entre autres les jonctions de la strie Z aux membranes cellulaires, les attaches inter-filamentaires, les jonctions musculo-tendineuses (27). Ce sont là les résultats d'un ensemble de travaux qui suggèrent également que la strie Z serait formée, comme les desmosomes, en relation avec les membranes cellulaires (52-27). Ils expliqueraient la nature lipidoprotéique de la strie Z avancée par d'autres auteurs (46).

La composition chimique des myofilaments est essentiellement protéique. La mise en oeuvre de techniques fines d'analyses, d'extractions différentielles aux solutions salines et de marquage aux anticorps (54-56) a permis d'identifier les protéines de structure des deux types de filaments (46-1-41).

Elles sont représentées à 90 - 95 % par trois protéines fibreuses dont :

- la myosine 55 % limitée aux filaments épais
- l'actine 25 % limitée aux filaments fins
- la tropomyosine 10 à 15 %.

Les 5 à 10 % restants sónt représentés par des protéines de structures mineures : contractine, troponine, méta-myosine, α-actinine et par des résidus inextractibles de myosine, d'actine et de tropomyosine.

L'étude de ces protéines contractiles et leurs propriétés seront envisagées au paragraphe de la biochimie musculaire.

Cette structure particulière de l'ensemble de la fibre musculaire striée squelettique avec les relations étroites existant entre ses organites et avec le milieu extérieur permet de penser que toute perturbation humorale extérieure sera très rapidement communiquée dans l'intimité même de la fibre et inversement.

B - BIOCHIMIE MOLECULAIRE DE LA FIBRE

Outre les protéines contractiles représentées surtout par la myosine, l'actine et la tropomyosine, la matière sèche du tissu musculaire contient d'autres protéines, non contractiles, telles que la myoglobine, des enzymes, des albumines ; elle contient également des nucléotides (N.A.D., F.A.D.), de l'A.T.P., du phosphagène, des lipides simples et complexes, des glucides et des matières minérales.

1° - Les matières minérales

Elles représentent de 1 à 1,5 % de la matière sèche. Ce sont surtout les cations K^+, Na^+, Mg^{++}, Ca^{++} et les anions phosphate, chlorure, bicarbonate, sulfate.

Des études menées in vitro sur des solutions d'actomyosine ont montré le rôle essentiel des ions bivalents Mg^{++} et Ca^{++}(42-34) dans le mécanisme de la contraction. Il ressort de ces expériences (34) que l'ion Mg^{++} est nécessaire pour provoquer la dissociation du complexe d'actomyosine (complexe protéique purifié obtenu par extraction à partir d'un muscle et contenant les principales fractions contractiles de la myofibrille).

Cette dissociation préalable est la condition indispensable pour que se produise la "superprécipitation" induite par les ions Ca^{++} en présence d'A.T.P.

Ces phénomènes sont considérés comme analogues à l'acte de la contraction in vivo.

Les ions K^{+} interviennent dans la conduction de l'influx et sont indispensables au maintien du cycle de la contraction musculaire. In vivo, la diminution de sa concentration entraîne une grande myasthénie (6 bis).

2° - *Les glucides du muscle*

Ils sont représentés essentiellement par le glycogène dont la quantité, variable suivant le régime alimentaire et le travail, est comprise entre 0,5 % et 2 % de la matière sèche. Cela constitue la réserve énergétique du muscle, correspondant à la moitié du glycogène total de l'organisme, l'autre moitié étant contenue dans le foie.

Ce polysaccharide est déjà présent dans la fibre musculaire embryonnaire. La synthèse des protéines fibreuses du muscle précède son accumulation mais l'arrangement des myofilaments évolue parallèlement à une multiplication soudaine et massive des particules de glycogène (20).

Ces dernières forment des amas dont les localisations préférentielles sont la région juxtanucléaire puis les membranes lisses du réticulum endoplasmique et peut-être quelques vésicules du système lysosomial.

Dans la fibre musculaire embryonnaire, le glycogène peut se présenter soit sous forme de particules élémentaires d'un diamètre voisin de 40 mμ ; soit sous forme de rosettes dont la taille varie de 60 à 120 mμ et même davantage. Ces rosettes sont toutefois différentes de celles du foie. Elles sont composées de grains élémentaires ou forme β de glycogène mentionnées plus haut. Leur synthèse serait

assurée par les ribosomes souvent inclus dans les amas glycogéniques. Les molécules de glycogène préexistantes serviraient d'initiatrices aux enzymes de synthèse élaborées par les ribosomes (20).

Au cours de la myogénèse, la quantité de glycogène diminue dans la fibre qui, arrivée à l'état adulte, ne contient plus que des particules β, après avoir présenté des formations spéciales dites "corps glycogéniques" limitées par des membranes du reticulum endoplasmique.

Les particules β de glycogène de la fibre striée adulte apparaissent libres dans le sarcoplasme ; elles sont plus ou moins sphériques et leur taille voisine de 35-40 mμ (59) pourrait varier selon le traitement préalable de la coupe musculaire (47). (Schéma N° 2).

Ces grains élémentaires qui ne sont ni entourés de membranes, ni inclus dans des organites cellulaires, montrent une grande affinité pour les membranes lisses du réticulum sarcoplasmique, surtout au niveau de la bande I. (Schéma N° 3).

D'autres dispositions peuvent être observées ailleurs dans le sarcoplasme ; les particules sont alors soit groupées en amas selon un mode plus ou moins régulier, soit en rangs très serrés (entre les myofibrilles) où la présence de ponts entre les unités de glycogène ne peut pas être exclue. Enfin quelques corpuscules apparaissent plus denses et plus gros que les autres, ce sont les structures γ qui seraient formées de 4 ou 6 grains élémentaires.

Après extraction par ultracentrifugation et purification par des procédés divers (59) le glycogène obtenu contient encore 3 % de protéines correspondant aux débris de reticulum sarcoplasmique. Ces membranes sont liées très fermement aux grains β glycogène et conservent encore leur activité phosphorylase. Des observations ont montré qu'à ces zones de contact, les particules glycogéniques pouvaient être contenues dans des dépressions de la membrane ou être accolées à une

protusion de celle-ci faisant penser à une zone d'aspiration.

Cette disposition particulière du glycogène permet de penser qu'il sera sollicité en premier lorsque l'activité musculaire nécessitera un apport énergétique. En réalité, les myofilaments utilisent l'énergie libérée par la dégradation de l'A.T.P., mais ce dernier est en quantité très faible dans la fibre donc très vite détruit et c'est grâce au catabolisme du glycogène que l'A.T.P. peut être régénéré.

Des expériences ont montré qu'un muscle isolé peut se contracter tant qu'il n'a pas épuisé toute sa réserve de glycogène.

3° - *Les protéines non contractiles*

- *la myoglobine*

Cette protéine est présente dans le sarcoplasme en quantité variable de l'ordre de 0,2 à 0,5 % de la matière sèche. La myoglobine, responsable de la couleur du muscle strié squelettique, est une petite molécule renfermant un hème et dont la structure est remarquablement similaire à celle d'une chaîne de l'hémoglobine.

Des travaux ont précisé sa localisation dans le sarcoplasme (16) montrant d'une part une accumulation dans la zone de la bande A et une petite quantité autour de la strie Z, d'autre part, un contact étroit entre la myoglobine et les myofilaments. La signification physiologique de cette association n'a pu être précisée, mais il semble admis qu'un des rôles de la myoglobine serait de faciliter la diffusion de l'oxygène entre les capillaires et les mitochondries.

Il a été montré que la myoglobine peut se combiner réversiblement à l'oxygène pour donner l'oxymyoglobine et qu'elle présente une affinité pour ce gaz, beaucoup plus importante que l'hémoglobine. (Schéma N° 4).

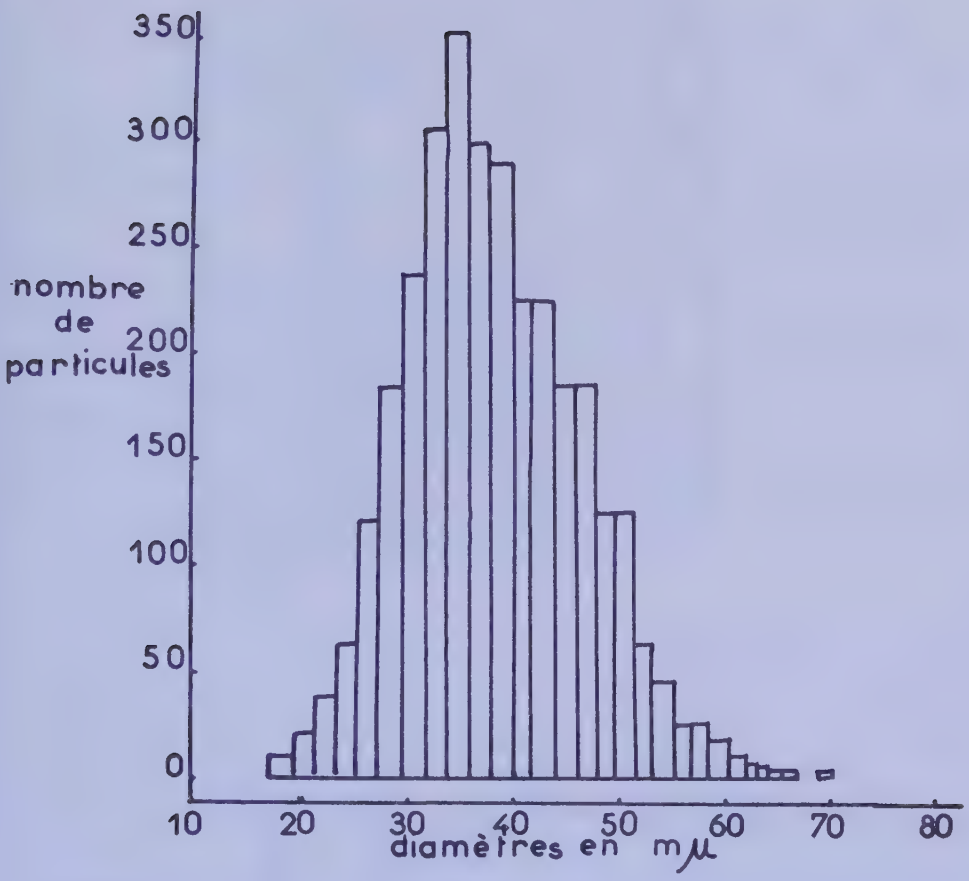


Schéma 2.

Histogramme montrant la répartition des diamètres des particules de glycogène musculaire dans une population de 2500 grains. (D'après WANSON J. C. et DROCHMANS P. - 59).

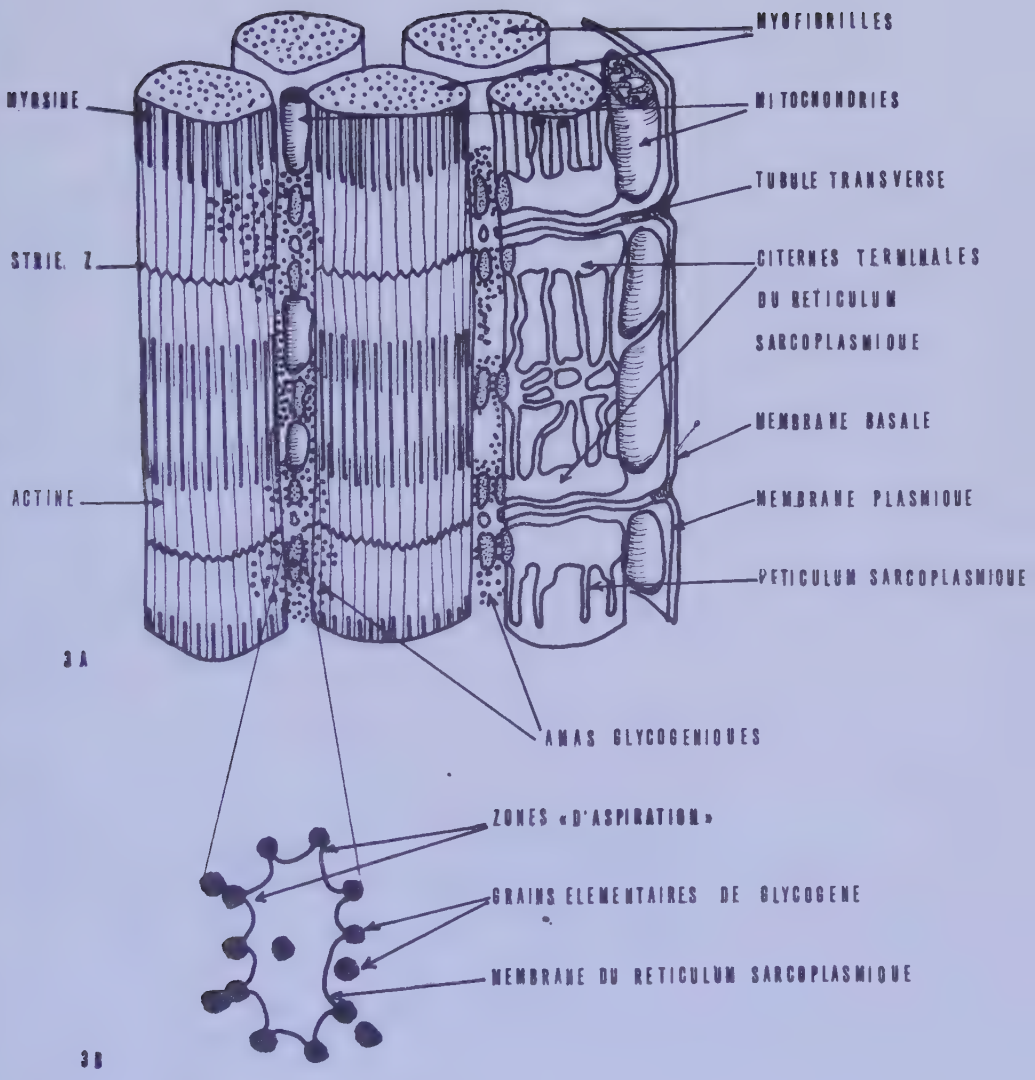


Schéma 3.

3 A. - Les amas glycogéniques dans la fibre musculaire striée squelettique. Les particules de glycogène sont plus nombreuses dans les zones correspondant aux bandes I et particulièrement au voisinage du reticulum sarcoplasmique.

3 B. - Cette section du reticulum sarcoplasmique vue à un fort grandissement montre l'accolement des particules de glycogène à la membrane qui prend l'aspect de zones d'aspiration. (D'après WANSON J. C. et DROCHMANS P.-59).

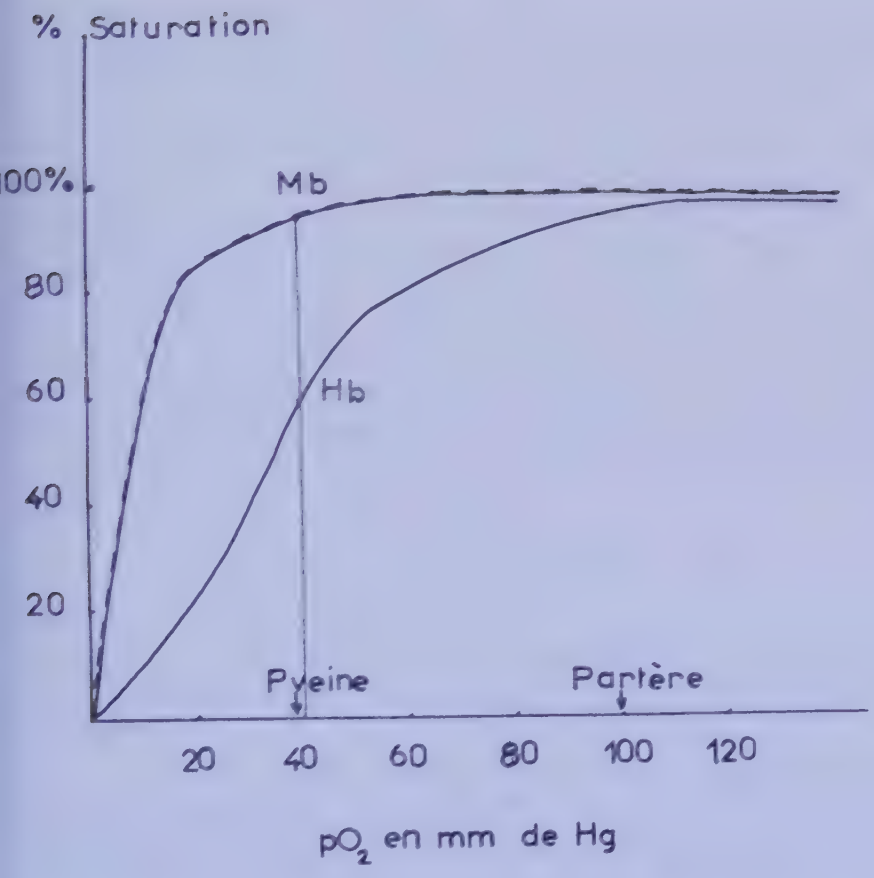


Schéma 4.

Courbes comparées de saturation de la myoglobine et de l'hémoglobine en oxygène. L'affinité de la myoglbine pour l'oxygène montre clairement son rôle dans le transport de ce gaz à l'intérieur de la fibre musculaire.
(D'après POLOHOVSKI M. - 45).

La saturation étant très rapide, elle est capable de fixer l'oxygène capillaire même à des pressions partielles inférieures à celle du sang veineux pour le restituer ensuite dans le sarcoplasme (44).

- *les autres composés protéiques*

Ils sont représentés surtout par l'A.T.P., l'A.D.P. la phosphocréatine et toute la série des enzymes:phosphatases, déshydrogénases, oxydases etc... Si leur importance pondérale est faible, ils ont un rôle majeur dans l'activité musculaire. L'A.T.P. qui est le fournisseur essentiel de l'énergie utilisée par les myofilaments est indispensable aussi bien dans les phénomènes de la relaxation des myofibrilles que dans ceux de la contraction (50-24). Sa disparition entraîne l'état de rigidité cadavérique qui se produit plus ou moins vite selons la richesse de fibres en glycogène (55-54). C'est, en effet, à partir du glycogène et de la phosphocréatine ou de l'A.D.P. que l'A.T.P. doit être sans cesse renouvelé. L'étude de ces mécanismes sera développée au chapitre II concernant la glycolyse.

4° - Les protéines contractiles

- *la myosine*

Elle est la plus abondante des protéines contractiles avec une quantité voisine de 55 à 60 % de celles-ci.

Le poids moléculaire de la myosine est estimé à 500 000 environ. Les macromolécules sont de forme allongée et mesurent de 1 600 Å à 2 200 Å de longueur pour un diamètre de 22 à 24 Å. Elles portent à une extrémité des renflements dont la taille est de 25 Å, ce qui correspond à une épaisseur totale de 45 Å environ. Certains auteurs (61) ont calculé le nombre de molécules de myosine par filaments épais; il se situerait aux alentours de 400.

L'hydrolyse trypsique de la myosine permet de la scinder en deux composants : les méromyosines (21). L'une est dite légère, c'est la "Light" Méromyosine ou L.M.M. qui a un poids moléculaire de 120 000, l'autre est dite lourde, c'est la "Heavy" Méromyosine dont le poids moléculaire approché est de 350 000.

La myosine possède deux propriétés essentielles : une activité ATPasique et la possibilité de former un complexe avec l'actine en donnant l'actomyosine. Ces deux phénomènes ont leurs sites actifs sur le H.M.M. qui occupent la partie centrale des filaments épais alors que les parties latérales sont composées de L.M.M. (41).

L'A.T.P. serait fixé sur la H.M.M. par l'intermédiaire de groupements thiols actifs des séquences peptidiques terminales de la myosine (isoleucyl-cystéinylarginine). L'activité enzymatique, faible pour la H.M.M. seule et inhibée par les ions Mg^{++}, est importante pour le complexe actomyosine et augmentée par ces mêmes ions. (Schéma N° 5).

- *l'actine*

Elle représente 25 % environ des protéines contractiles. L'actine peut se présenter sous deux formes : une forme monomère : l'actine globulaire G, de poids moléculaire égal à 70 000, une forme polymère : l'actine fibreuse F. Cette polymérisation reversible est conditionnée par la présence d'ions tels que K^{+}, Mg^{++}, Ca^{++}. L'A.T.P. qui est nécessaire à cette réaction serait également uni à l'actine par des groupements thiols. L'activation de l'ATPase de la H.M.M. dans le complexe actomyosine semble due à l'actine F. Des études concernant la localisation de l'actine (41) ont montré nettement qu'elle constituait les filaments fins de la strie Z jusqu'à l'intérieur de la bande A. Cependant, aucune preuve n'a pu être apportée quant à sa présence dans la strie Z elle-même.

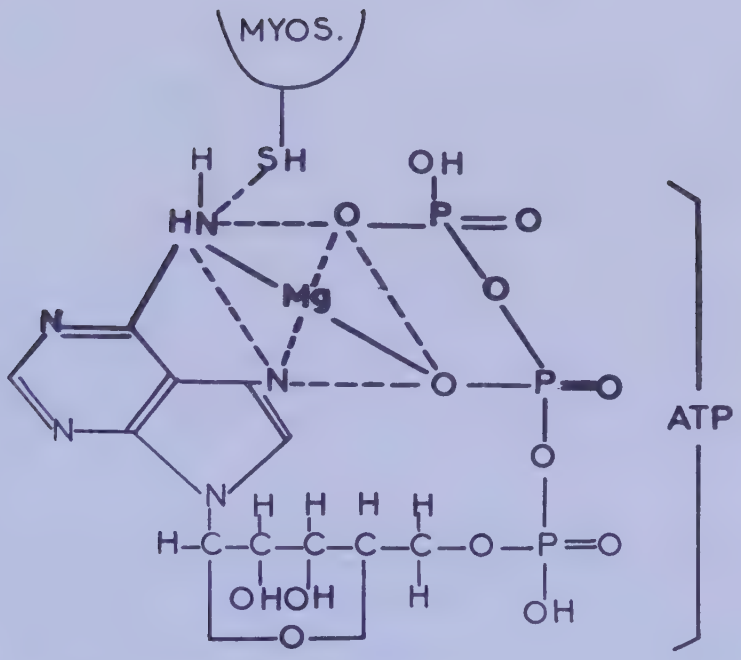


Schéma 5.

Mode de fixation de l'A.T.P. sur un centre actif de la myosine (MYOS) par l'intermédiaire d'un groupement thiol. (S- H-) ; Ce modèle expliquerait le rôle inhibiteur des ions magnésiens (Mg) par formation d'un complexe avec l'A.T.P. (D'après FLORKIN M. - 12).

Une autre propriété essentielle de l'actine est liée à la formation de l'actomyosine. Ce complexe, à l'état de gel, montre une réaction remarquable vis-à-vis de l'A.T.P. qui se traduit par un raccourcissement d'environ 10 % des fibres d'actomyosine. Le phénomène cesse en même temps que l'action de l'A.T.P. Ce système gel d'actomyosine-A.T.P. constitue donc un schéma pour l'étude de la contraction musculaire.

- *la tropomyosine*

Elle représente 10 à 15 % de la masse des protéines contractiles. La tropomyosine est une macromolécule allongée dont le poids moléculaire est de 53 000 ; son diamètre est de 14,5 Å pour une longueur de 400 Å. Elle est localisée essentiellement au niveau de la strie Z (41). En fait, la nature biochimique de la strie Z est encore mal connue. Les difficultés d'extraction et de marquage aux anticorps ont conduit certains auteurs à admettre la possibilité que plusieurs protéines y sont associées entre elles (tropomyosine, actine, myosine β, α actinine) (56) ou même sous forme de lipoprotéines comme semble l'indiquer la sensibilité de la strie Z à l'acétone (46).

Le rôle de la tropomyosine est peut-être lié à sa possibilité de polymérisation et de formation d'un gel très fortement orienté et cohérent (33).

Elle interviendrait dans les contractions musculaires soutenues sans grande dépense d'énergie.

C - DONNEES RELATIVES A LA CONTRACTION MUSCULAIRE

Le résumé des connaissances actuelles, en matière de structure et de biochimie de la fibre musculaire striée squelettique, montre que, si des travaux importants et précis ont permis de progresser dans ce domaine, beaucoup d'inconnues et d'incertitudes subsistent encore. Elles relèvent principalement de difficultés d'étude tenant d'une part à la fragilité des éléments

cellulaires vis-à-vis des procédés d'extraction ou de fixation (2) et, d'autre part, à la complexité des associations des éléments entre eux. Ces difficultés sont encore plus grandes pour l'étude de la cinétique musculaire compte tenu de la labilité des liaisons intermoléculaires qui se produisent alors.

La contraction musculaire résulte d'un ensemble de transformations physicochimiques qui se traduisent sur le plan morphologique par une tendance au raccourcissement des fibres. De nombreuses observations rapportent que pendant la contraction, il y a un effacement progressif de la strie de Hensen, sans variation de longueur de la bande A, et un rapprochement des stries Z. A l'échelle des myofilaments, il se produit un glissement des brins d'actine entre les filaments épais de myosine (5-52). Leur progression serait assurée par le déplacement des liaisons qui se forment entre l'actine et la myosine (4). Les ponts myosiniques passant d'un site actif de l'actine à un autre adjacent entraîneraient les filaments fins à la manière d'un mécanisme à cliquets. La coordination des mouvements dans le même sens serait due à un arrangement moléculaire symétrique des filaments par rapport au centre du sarcomère. (Schéma N° 6).

Des études ont montré qu'une molécule d'A.T.P. est nécessaire au cycle de la formation de ponts aboutissant à une progression de 130 Å (12). Cela correspond à l'utilisation de 70 moles d'A.T.P. par seconde.

La quantité d'A.T.P. nécessaire à une activité soutenue de la fibre musculaire va donc être considérable et, c'est à la glycolyse principalement que revient le rôle de sa constante régénération.

Nous ne ferons que citer les trois moyens beaucoup plus limités qui sont par ordre d'importance décroissante :

- l'oxydation des acides gras libres

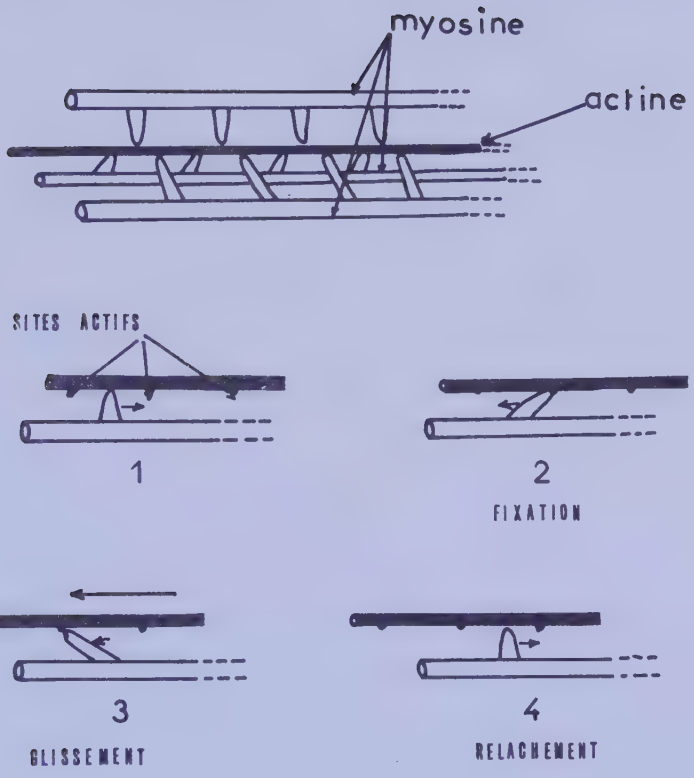


Schéma 6.

Progression des brins d'actine lors de la contraction musculaire.

Le mouvement global est assuré par la répétition des trois stades élémentaires : fixation, glissement, relâchement sur des sites successifs.
(D'après HUXLEY H. E. in FLORKIN - 12).

- une transphosphorylation à partir de la phosphocréatine et de l'A.D.P., catalysée par la phosphocréatine-kinase libérant la créatine.

- une transphosphorylation entre deux A.D.P., catalysée par la myokinase, produisant de l'acide adénylique, rapidement toxique pour la cellule.

CHAPITRE DEUXIEME

LA GLYCOLYSE DANS LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE

La glycolyse musculaire peut être divisée artificiellement et pour en faciliter l'étude, en trois parties qui s'enchaînent et qui sont successivement :

. la glycogénolyse,
. la glycolyse anaérobie,
. la glycolyse aérobie.

A - *LA GLYCOGENOLYSE*

Des observations déjà anciennes ont montré que le travail musculaire augmente considérablement le catabolisme du glucose.

Ainsi, le quotient respiratoire s'infléchit vers 1, indiquant une utilisation presque exclusive d'hydrates de carbone. Des dosages comparatifs de la glycémie artérielle et veineuse au niveau du muscle en activité ont établi des rapports de 10 à 1 et même 15 à 1. Si, cette activité se poursuit assez longtemps, la glycémie de l'organisme baisse cependant que le taux des déchets de la glycolyse augmente, en particulier, la lactacidémie.

Le glucose utilisé provient de la dégradation du glycogène et il paraît évident que ce sont les réserves musculaires qui vont être sollicitées en premier. C'est ce qui ressort des études déjà mentionnées dans le premier chapitre, montrant les rapports très étroits entre les particules de glycogène et les systèmes membranaires possédant des sites enzymatiques complexes (59). Immédiatement, la question se pose de savoir quelle est la cause ou l'ensemble de causes qui président à l'accélération de la glycogénolyse lorsque la fibre musculaire entre en activité.

Il semble bien que plusieurs mécanismes soient impliqués dans ce processus.

Le métabolisme énergétique de la fibre, considéré sous son aspect purement biochimique, apparaît comme un ensemble de réactions qui évoluent en chaîne, allant du glycogène à l'A.T.P. Un équilibre s'établit dans ce système entre tous les intermédiaires et au moment de la contraction lorsqu'il se produit une consommation brutale d'A.T.P. en bout de chaîne ; ce déséquilibre se répercute jusqu'au glycogène par le jeu de la loi d'action de masses. Ce facteur, dont on ne peut nier l'existence, reste cependant assez grossier et ne fait intervenir que les concentrations en substrats métaboliques sans tenir compte du rôle des enzymes des diverses séquences.

En effet, certaines de ces enzymes ont besoin d'être modulées ou orientées dans leur action pour répondre aux besoins actuels de la cellule musculaire.

Ce rôle revient à des médiateurs, eux-mêmes sous la dépendance d'hormones qui ne sont pas toutes connues, mais parmi lesquelles se trouvent l'adrénaline en premier lieu, la noradrénaline, le glucagon, l'A.C.T.H. et vraisemblablement d'autres encore.

Des dosages ont montré que le taux d'adrénaline circulante augmente beaucoup au cours du travail musculaire ; sa sécrétion est réglée par la glycémie, mais aussi par d'autres facteurs dont la contraction. Celle-ci se comporterait, en effet, comme un stress à point de départ cellulaire, se répercutant ensuite dans l'organisme entier.

Le mécanisme d'action de l'adrénaline a fait l'objet de nombreuses études (36) qui connaissent un regain d'intérêt à l'heure actuelle, car le schéma proposé pourrait être étendu à la majorité des hormones.

L'adrénaline, inactive sur des fractions enzymatiques isolées, agit sur des récepteurs membranaires spécifiques de la cellule,étroitement associés au système adényl-cyclasique qui est alors activé. L'adényl-cyclase libéré va catalyser la formation de l'adénosine monophosphate-cyclique ou A.M.P.c. L'A.M.P.c à son tour est responsable de la transformation de la phosphorylase *b* en phosphorylase *a* beaucoup plus active. (Schéma N° 7).

La stimulation se fait par l'intermédiaire d'une kinase de la phosphorylase b kinase. La réaction est équilibrée par une phosphorylase-phosphatase. L'activation de la kinase pourrait également se produire sous l'influence de l'influx nerveux et des ions Ca^{++} libérés au moment de la contraction (45). Elle correspond à une phosphorylation nécessitant la présence de 4 A.T.P. L'action de la phosphorylase *a* qui est une transglucosidase se situe au niveau de la liaison α.1-4 du glucose situé en bout de chaîne linéaire.

D'autres enzymes interviennent pour hydrolyser les ramifications. Parmi elles, la mieux connue est l'amylo-1-6 glucosidase qui agit sur les liaisons 1-6 quand il n'y a qu'un chaînon glucosé ramifié. La dégradation se poursuit par transfert des bouts de chaînes ramifiées sur les chaînes linéaires.

Le glucose 1-phosphate produit ou ester de Cori se transforme reversiblement en glucose-6-phosphate ou ester de Robison, isomère du premier. La réaction a lieu sous l'influence de la phosphoglucomutase à l'état phosphorylé dont le pH optimum d'action se situe entre 7,5 et 9,2. Peut être faut-il rapprocher cette particularité des changements qui interviennent dans la fibre musculaire au tout début de la contraction. Le pH cellulaire qui a tendance à diminuer lors de l'hydrolyse de l'A.T.P. augmente ensuite avec la libération de créatine basique. La vitesse de réaction de la mutase se trouverait ainsi accrue.

Le glucose-6-phosphate est à son tour soumis à l'action d'une isomérase, la phospho-hexose-isomérase

qui établit un équilibre entre l'ester de Robison et le fructose-6-phosphate ou ester de Neuberg.

La constante de réaction est :

$$K = \frac{[F.6.P.]}{[G.6.P.]} = 0,49$$

Une nouvelle mode d'A.T.P. est nécessaire à la phase suivante qui est une phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose 1-6 diphosphate. La transformation est catalysée par la phosphofructokinase. Cette enzyme est la moins active parmi celles qui interviennent dans la glycolyse. Cependant, c'est une des plus spécifiques et elle est considérée comme la clé de l'ensemble de ces réactions.

Le passage de l'ester de Neuberg à l'ester de Harden et Young qu'elle catalyse est pratiquement irréversible à cause d'un Δ F (variation d'énergie libre) très fortement négatif.

La réaction qui nécessite pour se produire la présence d'ions Mg^{++} est inhibée par l'oxygène et surtout par un excès d'A.T.P. Elle constitue donc déjà un premier mécanisme régulateur de la glycolyse proprement dite qui commence avec la dégradation de l'ester de Harden et Young. En s'accumulant l'A.T.P. non utilisé va bloquer la glycogénolyse à ce niveau.

B - LA GLYCOLYSE PROPREMENT DITE (et ses débouchés)

C'est à partir du fructose 1-6-diphosphate que les réactions glycolytiques, intervenant sur les trioses produits, vont être génératrices d'énergie.

Les conditions d'oxygénation de la fibre musculaire jouent un rôle primordial dans l'orientation du catabolisme des trioses. En anaérobiose, l'acide lactique représente le catabolite terminal, il est repris par la circulation générale et peut servir à la resynthèse du glycogène dans le foie. En aérobiose, au contraire, la dégradation des trioses se poursuit dans l'appareil mitochondrial en entrant dans le cycle de Krebs.

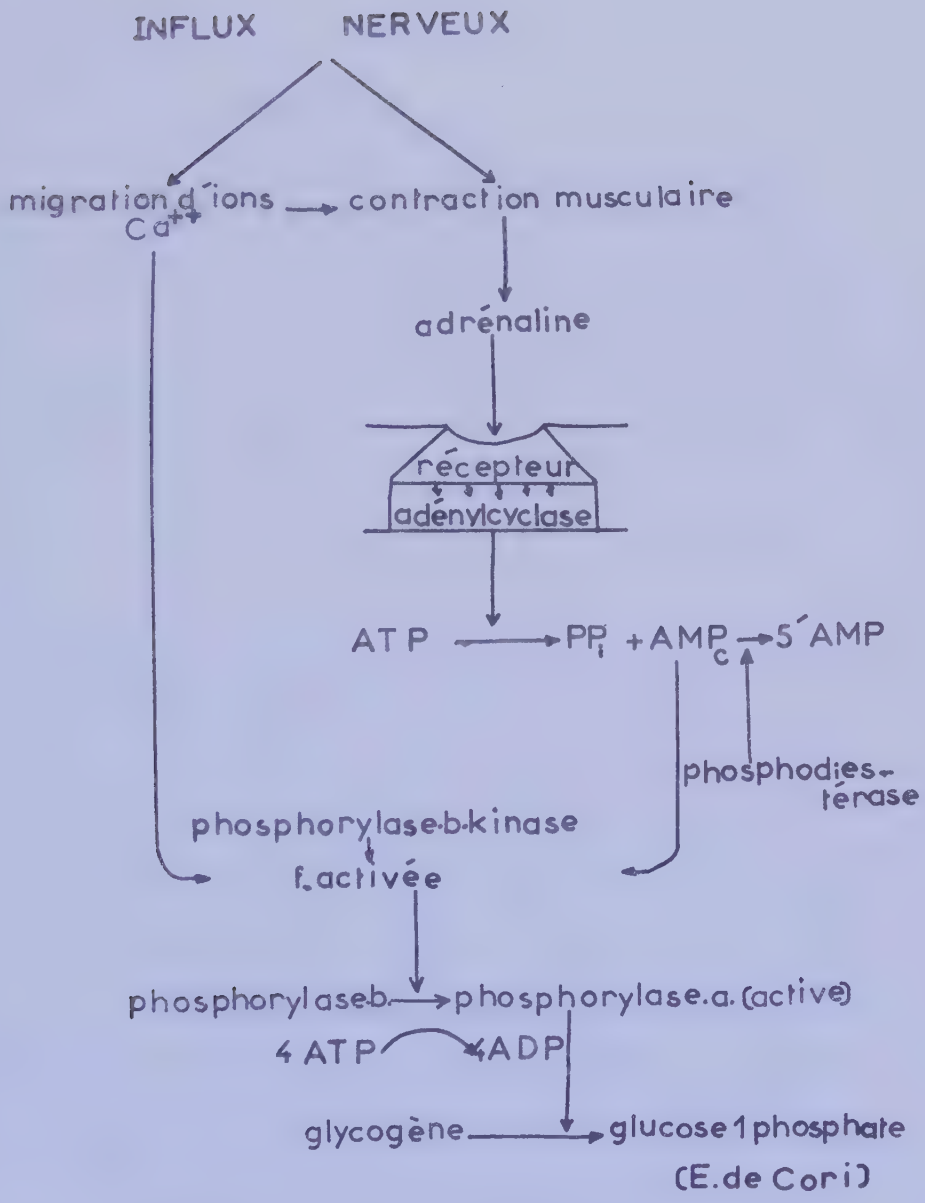


Schéma 7.

Activation hormonale de la glycolyse. D'autres hormones qui ne figurent pas sur ce schéma, peuvent intervenir avec l'adrénaline.

1° - La glycolyse anaérobie

L'ester de Harden et Young ou α D. fructose 1,6-diphosphate est scindé en deux trioses-phosphates avec lesquels il est en équilibre tautomérique sous l'action d'une aldolase, la zymohexase de Meyerhof. Cette enzyme est inhibée par les métaux lourds.

La phosphodihydroxyacétone se transforme réversiblement en 3 phosphoglycéraldéhyde. La réaction est catalysée par l'isomérase du triose-phosphate avec une constante d'équilibre :

$$K = \frac{[\text{ phosphodihydroxyacétone }]}{[\text{ 3 phosphoglycéraldéhyde }]} = 2{,}2 \quad 10^{1}.$$

En réalité, la phosphodihydroxyacétone se transforme, suivant les besoins cellulaires, en une forme énolique qui, à son tour, donne l'aldéhyde-3-phosphoglycérique.

C'est à ce stade qu'intervient la première réaction d'oxydoréduction anaérobie en présence de la déshydrogénase de l'aldéhyde et de phosphate inorganique. Le N.A.D. oxydé (nicotamide adénine dinucléotide) en est le coenzyme. L'aldéhyde 3 phosphoglycérique est phosphorylée en acide 1-3 diphosphoglycérique qui comporte une liaison riche en énergie. La constante d'équilibre est voisine de 1 ; la réaction bien que réversible se poursuit dans ce sens car une enzyme très spécifique, la 3-phosphoglycérate kinase isolée et purifiée par BUCHNER - cité par FLORKIN (12) catalyse le transfert de la liaison riche sur l'A.D.P. pour former l'A.T.P. avec une constante d'équilibre : $K = 3{,}1 \quad 10^{3}$.

L'acide 3 phosphoglycérique restant est transformé en acide 2 phosphoglycérique. L'enzyme responsable, la phosphoglycéromutase du muscle, ne nécessite pas l'acide 2-3 phosphoglycérique comme coenzyme alors que c'est le cas dans d'autres tissus.

L'acide 2-phosphoglycérique est alors soumis à l'action d'une énolase catalysant la deuxième oxydoréduction anaérobie. L'acide 2-phosphoénol-pyruvique qui est produit selon une constante d'équilibre voisine de 1,4 comporte une liaison riche en énergie. Il y a en même temps élimination d'une molécule d'eau. L'énolase n'est active qu'en présence d'ions Mg^{++} et l'addition de fluorure au milieu, inhibe la réaction par formation d'un complexe de fluorophosphate de magnésium.

En présence d'ions K^{+}, Mg^{++} et de la pyruvate-kinase, la liaison riche en énergie de l'acide phosphoénol-pyruvique est transférée sur une molécule d'A.D.P. en donnant de l'A.T.P. L'évolution se poursuit dans le sens de la synthèse d'A.T.P. avec une constante d'équilibre : $K = 2.\ 10^{3}$.

Finalement, l'acide énolpyruvique se transforme réversiblement en acide pyruvique et constitue l'ultime étape de la glycolyse anaérobie susceptible de fournir de l'énergie.

- la fermentation lactique

Le N.A.D.$^{+}$ réduit par le 3-phosphoglycéraldéhyde existe en faible quantité dans la fibre musculaire. S'il n'était pas regénéré, la dégradation des trioses s'arrêterait très vite en l'absence d'oxygène. Cette situation est évitée par l'intervention d'une enzyme, la lactico-déshydrogénase, présente au niveau des membranes du reticulum sarcoplasmique (RC). L'acide pyruvique est réduit en acide lactique par l'hydrogène du N.A.D.H. (H^{+}) qui peut alors recommencer un nouveau cycle.

L'acide lactique produit est inutilisable pour la fibre en anaérobiose. Il est repris par la circulation générale et il est soit reconverti en glycogène dans le foie, soit éliminé dans les urines.

L'accumulation de cet acide dans le tissu musculaire conduit à l'état de fatigue qui se traduit par une diminution considérable du pouvoir de contraction.

L'ensemble de ces réactions, reproduites en un tableau synoptique (fig. 8) se déroule dans le sarcoplasme au voisinage des membranes du systeme réticulosarcoplasmique. Le bilan énergétique est relativement faible puisqu'il ne donne au total qu'une mole d'A.T.P. par triose. Il faut cependant tenir compte qu'une grande partie de l'acide lactique sert à nouveau sous forme de glycogène et, de ce fait, l'énergie potentielle de sa molécule ne peut être considérée comme perdue dans les calculs de rendement.

2° - *La glycolyse aérobie*

La dégradation des deux trioses-phosphates issus de la scission du fructose 1.6 diphosphate se poursuit jusqu'à l'acide pyruvique. A ce stade, la formation de l'acide lactique est inhibée par l'oxygène et deux phénomènes nouveaux apparaissent. Le N.A.D. réduit par l'aldéhyde 3.phosphoglycérique va être oxydé dans la mitochondrie.

Son passage direct à travers les membranes étant impossible (12), l'hydrogène doit être transféré par un substrat intermédiaire. Ce rôle revient principalement à l'α-glycérophosphate, produit de la réduction de la phosphodihydroxyacétone, catalysée par l'α glycérophosphate-déshydrogénase. L'α-glycérophosphate pénètre dans la mitochondrie où l'hydrogène est repris par le N.A.D., puis le F.A.D. et introduit dans la chaîne respiratoire.

L'acide pyruvique, quant à lui, va passer dans les mitochondries en quantité variable avec leur capacité de dégradation. Là, après une série de transformations, il va être intégré au cycle de Krebs.

Nous n'envisagerons ici que le catabolisme conduisant à la régénération de l'A.T.P. en laissant de côté les réactions de carboxylation de Wood et Werkman.

- *Le cycle de Krebs*

L'acide pyruvique subit en premier lieu une décarboxylation oxydative catalysée par une enzyme spécifique : la pyruvate décarboxylase nécessitant la présence de 4 coenzymes : la thiamine pyrophosphate, l'acide lipoïque, le coenzyme A, le N.A.D.$^+$ et d'effecteurs tels que : Mg^{++}. Le mécanisme d'action peut se diviser en 4 phases qui expliquent le rôle de chacun des coenzymes cités

1ère phase

acide pyruvique + thiamine pyrophosphate $\xrightarrow{Mg^{++}}$ acétaldéhyde T.P.P. + CO_2.

Elle montre le rôle de la vitamine B_1 révélé in vitro.

2ème phase

acétaldéhyde T.P.P. + acide lipoïque ⟶ ac. acétyldihydro.lipoïque + T.P.P.

nécessité de l'acide lipoïque.

3ème phase

ac. acetyldihydrolipoïque + Coenzyme A ⟶ acétyl Coenzyme A + ac. dihydrolipoïque

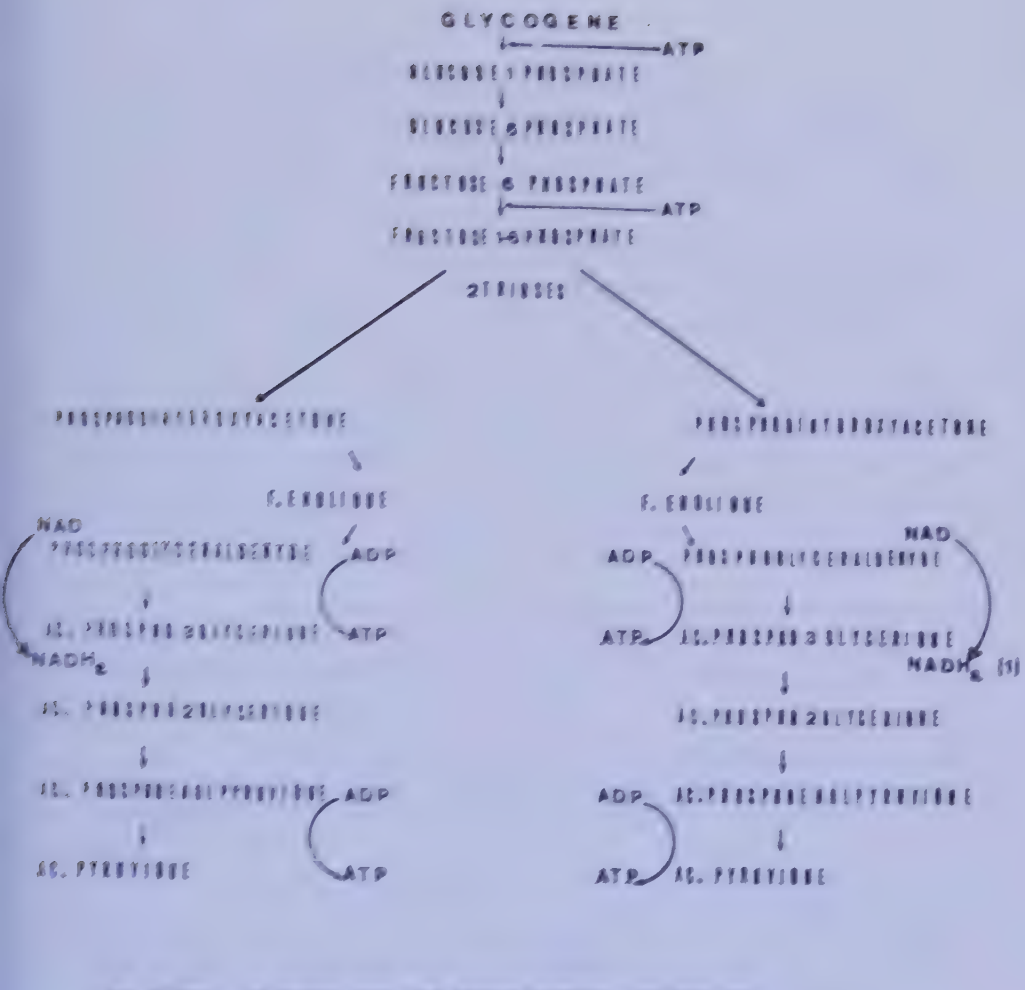
donc nécessité du coenzyme A.

4ème phase

ac. dihydrolipoïque + N.A.D. ⟶ NADH (H$^+$) + ac. lipoïque.

Le N.A.D. réduit est ensuite oxydé par la chaîne respiratoire en fournissant de l'A.T.P.

L'acide pyruvique décarboxylé est couplé au coenzyme A en donnant l'acétyl coenzyme A. Cette molécule, commune aux métabolismes glucidique et lipidique, possède une liaison riche en énergie qui lui permet de se fixer aisément sur une autre molécule en libérant le coenzyme A. La réaction a lieu avec



(1) $NADH_2$ EST OXYDE SOIT PAR L'ACIDE PYRUVIQUE (ANAEROBIOSE)

SOIT INDIRECTEMENT DANS LA MITOCHONDRIE GRACE A

L'α GLYCEROPHOSPHATE SELON LA REACTION

Figure 8

Ce bilan récapitulatif de la dégradation du glycogène jusqu'à l'acide pyruvique d'énergie récupérée sous forme d'A.T.P. correspond à celle fournie par la dégradation anaérobie d'une molécule de glucose puisque l'acide pyruvique représente dans ce cas l'étape ultime des réactions exoénergétiques.

l'acide oxaloacétique, indispensable au déroulement du cycle. L'acide oxaloacétique qui peut être synthétisé par carboxylation de l'acide pyruvique (réaction de Wood et Werkman déjà mentionnée) est restitué intégralement à la fin du cycle.

La condensation entre les deux substrats est catalysée par une enzyme : la citrate synthétase qui a été isolée à partir des membranes mitochondriales.

L'acide citrique qui est formé, est en équilibre chimique avec deux autres substances : l'acide cis-aconitique par perte d'une molécule d'eau et l'acide isocitrique par réhydratation différente. Cet équilibre qui correspond à 90 % d'acide citrique, 4 % d'acide cis aconitique et 6 % d'acide isocitrique est sous la dépendance d'une enzyme appelée aconitase.

Les réactions qui vont suivre aboutissent à une oxydation complète du radical acétyl. Elles procèdent par déshydrogénations successives en transférant l'hydrogène sur des dinucléotides.

L'acide isocitrique est déshydrogéné en acide oxalosuccinique par l'intermédiaire de l'isocitrico-déshydrogénase. L'hydrogène libéré est capté par le N.A.D.

L'acide oxalosuccinique est immédiatement décarboxylé en acide α. cétoglutarique à 5 carbones. Une nouvelle décarboxylation oxydative faisant intervenir le NAD^+ et 3 autres coenzymes, transforme après une série de réactions complexes cet acide α. cétoglutarique en succinyl coenzyme A possédant une liaison riche en énergie, cependant qu'une mole de N.A.D. réduit est libérée.

Généralement cette liaison est utilisée pour former un A.T.P. à partir de phosphate inorganique et d'A.D.P. (45).

Le coenzyme A est libéré et l'acide succinique restant est soumis à l'action de la succi[illegible]déshydrogénase qui catalyse le transfert de l'hydrogène su[illegible] le

F.A.D. en donnant l'acide fumarique. Cet acide est hydraté par l'intermédiaire de la fumarase, enzyme voisine de l'aconitase.

La réaction reversible conduit à l'acide L. malique. Ce dernier contient une fonction alcool sur laquelle la malico-déshydrogénase va exercer son action. Elle termine le cycle des déshydrogénations en catalysant le passage de l'hydrogène de la fonction alcool sur le N.A.D.$^+$ son coenzyme. L'acide oxalo-acétique avec sa fonction cétone est libéré et va pouvoir à nouveau être condensé avec l'acétyl coenzyme A du début de la chaîne. L'ensemble de ces réactions schématisées dans un tableau (n° 9) aboutit à la synthèse directe d'une seule mole d'A.T.P. Cependant, les 10 atomes d'hydrogène enlevés aux substrats métaboliques entrent dans le cycle des oxydations de la chaîne respiratoire et l'énergie libérée est couplée aux phosphorylations de l'A.D.P. en A.T.P.

- *Les oxydoréductions et les phosphorylations de la chaîne respiratoire*

Les premiers accepteurs de l'hydrogène libéré au cours des réactions précédentes sont représentés par les nucléotides N.A.D. et F.A.D. Ces deux corps vont être sur le point de départ d'une succession d'oxydoréductions qui permettent le transport de l'hydrogène jusqu'à son accepteur final : l'oxygène.

En réalité, il s'agit d'un transport d'électrons et de protons. Ces réactions font intervenir des déshydrogénases comme la N.A.D.H $_2$-déshydrogénase dont le coenzyme est le FAD. Ces enzymes à coenzymes flaviniques sont appelées flavoprotéines. Elles sont responsables de la teinte jaune des culots de mitochondries isolées. Les transporteurs d'électrons sont des protéines à groupements porphyriques voisins de l'hème de l'hémoglobine ; ce sont les cytochromes. Ils contiennent un atome de fer et ne sont actifs que s'ils sont associés à des phospholipides. Certains sont insolubles dans l'eau comme les cytochromes *a* et *b*,

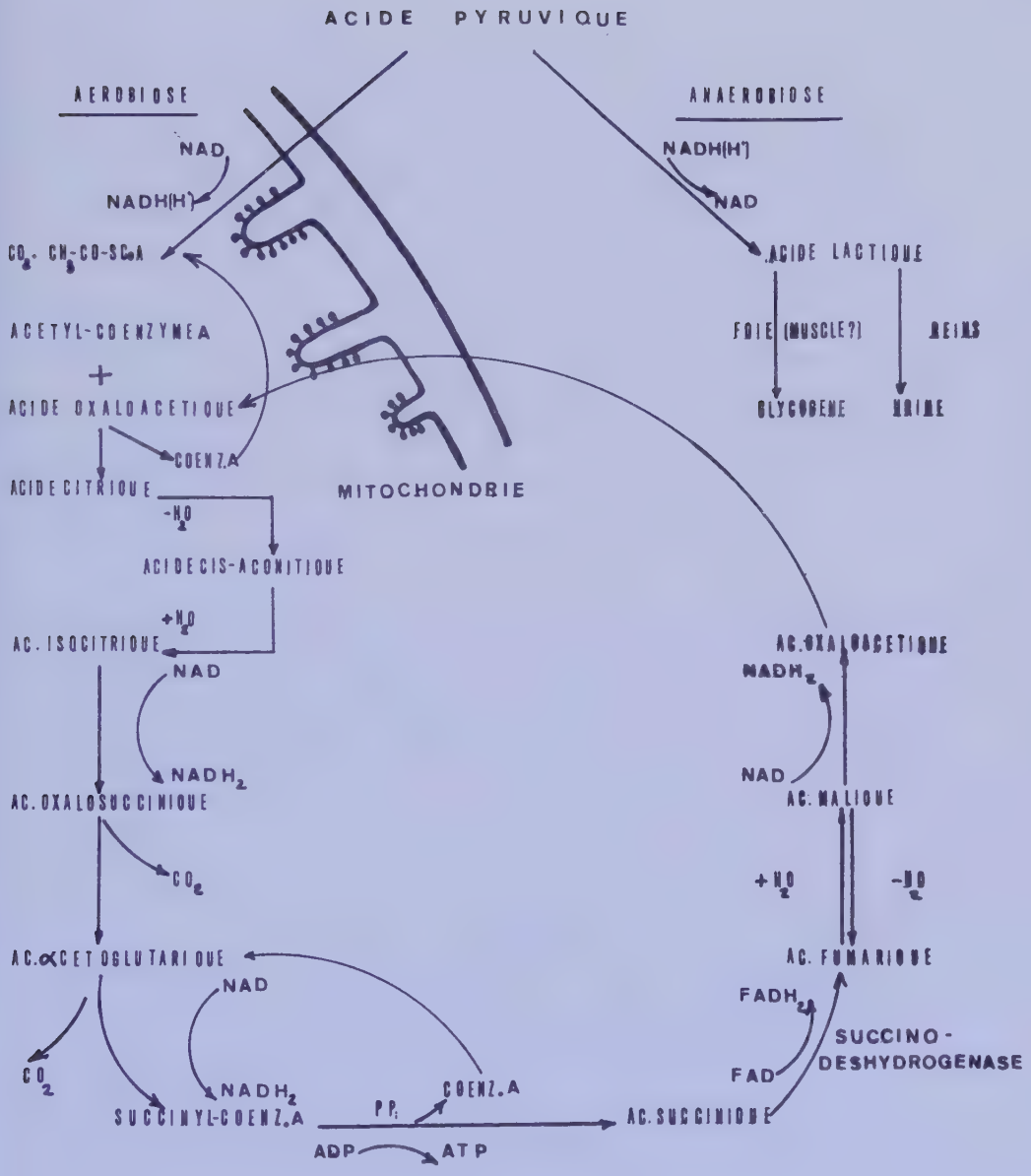


Tableau 9

Destinée de l'acide pyruvique.
En anaérobiose la fermentation lactique régénère le N.A.D. alors qu'en aérobiose, l'acide pyruvique est intégré au cycle de Krebs.

alors que d'autres sont solubles comme le cytochrome c.

Beaucoup de corps constituant la chaîne respiratoire sont encore inconnus, de même, que les systèmes enzymatiques qui associent l'énergie d'oxydoréduction de cette chaîne aux phosphorylations de l'A.D.P. en l'A.T.P.

Des études ont, cependant, pu établir un schéma de ces réactions (tableau n°10) et situer le moment de la synthèse de l'A.T.P. Elle se produit chaque fois qu'il y a une grande variation de l'énergie libre des systemes d'oxydoréduction. Il a été montré que l'oxydation d'une mole de N.A.D.H $_2$ aboutit à la formation de 3. A.T.P. alors que le F.A.D.H $_2$ en donne 2 (12).

3° - Le bilan de la glycolyse musculaire

L'A.T.P. représente la forme d'énergie utilisable par les myofibrilles pour la contraction musculaire. Il semble donc intéressant de chiffrer le rendement de la glycolyse en établissant le rapport entre l'énergie récupérée dans les moles d'A.T.P. et celle que contient à l'état potentiel la molécule du glucose soit 686 K calories environ.

- Rendement de la glycolyse anaérobie

Le tableau n° 8 montre que 2 moles d'A.T.P. sont utilisées pour le passage d'une mole de glucose en fructose 1-6 diphosphate. 4 A.T.P. sont ensuite fournis par la dégradation des 2 trioses-phosphates. Le bilan est donc positif et il représente un gain de 2 A.T.P.

Chaque A.T.P. renferme une énergie potentielle de 8 K calories environ. Le rendement s'établit donc comme suit :

$$R_{an} = \frac{2 \times 8}{686} \times 100 = 2,$$

Ce rendement peut paraître très faible ; en réalité, il faut tenir compte de l'énergie restante de l'acide lactique qui va être récupéré au niveau du foie. Le résultat montre cependant qu'en anaérobiose, la consommation de glucose devra être très forte pour assurer la contraction musculaire.

- *Rendement de la glycolyse aérobie*

L'A.T.P. est ici régénéré par trois moyens :

a) les oxydoréductions internes des trioses aboutissent comme précédemment à la synthèse de 2 A.T.P.

b) les oxydoréductions de la chaîne respiratoire couplées aux phosphorylations fournissent :

pour une mole de N.A.D.H_2 3 A.T.P.
pour une mole de F.A.D.H_2 2 A.T.P. (tableau n°10)

Ces réactions concernent par radical acétyl dégradé

4 moles de N.A.D.H_2 intramitochondrial
1 mole de N.A.D.H_2 extramitochondrial
1 mole de F.A.D.H_2

c) la synthèse de 1 A.T.P. est couplée à la formation de l'acide succinique à partir du succinyl-coenzyme A.
Le bilan pour l'A.T.P. est donc :

$$R_{aé.} = \frac{38 \times 8}{686} \times 100 = 44\ \%$$

Des calculs analogues ont établi que le rendement des phosphorylations de la chaîne respiratoires est lui aussi voisin de 45 %.

Ces résultats indiquent que plus de la moitié de l'énergie disponible n'est pas transformée en A.T.P. Cela montre que le couplage de la synthèse d'A.T.P. aux oxydations de la chaîne respiratoire est un processus théoriquement irréversible.

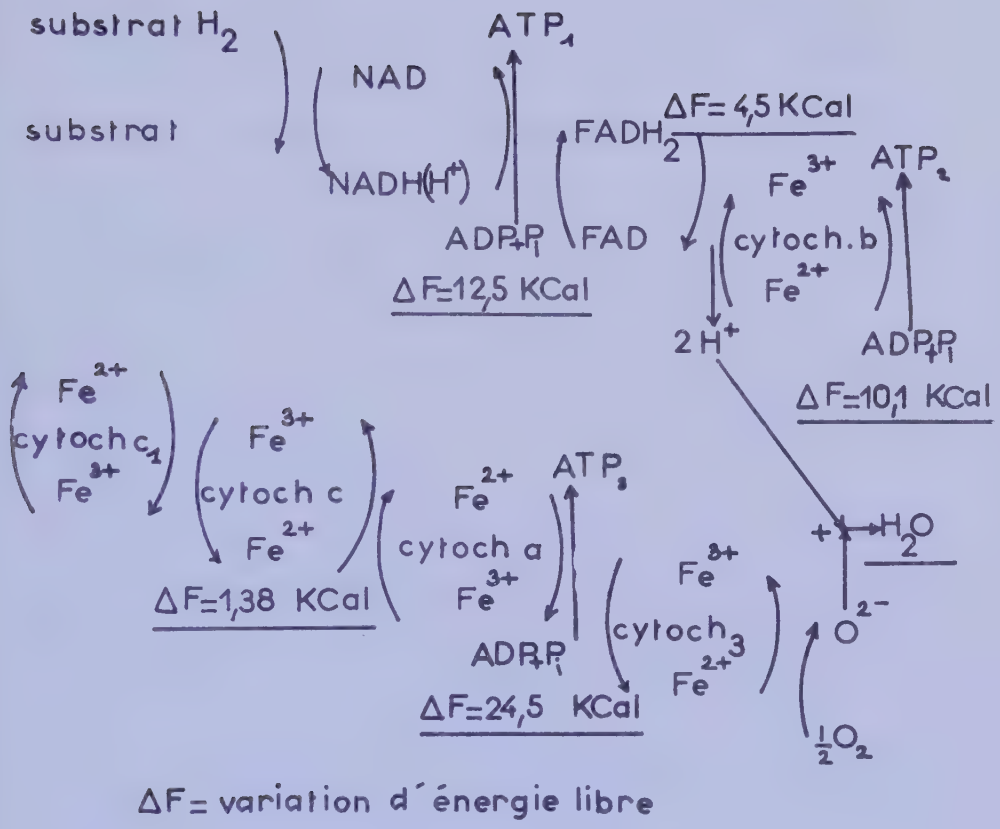


Tableau 10

Les phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire.

Le NAD H_2 et le FAD H_2 produits dans le cycle de Krebs sont oxydés par une série de réactions au cours desquelles chaque variation importante d'énergie (ΔF) est accompagnée de la formation d'une molécule d'A.T.P. (D'après BERKALOFF A. - 4).

La comparaison des deux rendements anaérobie et aérobie permet de dire que pour produire la même quantité d'énergie, la fibre musculaire utilisera environ 20 fois moins de glucose en présence d'oxygène qu'en son absence.

4° - Autres voies de dégradation du glucose

La voie de dégradation du glucose passant par les hexoses-phosphates, telle qu'elle vient d'être décrite selon le schéma d'Embden - Meyerhof ne constitue pas la seule possible dans la fibre musculaire.

L'existence d'autres systèmes glycolytiques n'est pas exclue et le mieux connu, à l'heure actuelle, est représenté par le shunt des hexoses-phosphates appelé "voies des pentoses" de DICKENS HORECKER ou WARBURG.DICKENS.LIPMANN.

La voie des pentoses procède d'une dérivation à partir du glucose-6-phosphate à un bout du cycle et à partir du fructose-6-phosphate ou des trioses phosphates à l'autre bout. Les réactions font intervenir des pentoses phosphates tels que le D.ribulose-5-phosphate et un heptose le D. sedoheptulose-7-phosphate.

Le catabolisme du glucose dans ce cas est de nature oxydative et les déshydrogénases qui y participent ont pour coenzyme, non plus le N.A.D., mais le N.A.D.P. Son rôle essentiel est donc de fournir des moles de $N.A.D.PH_2$, nécessaires à la cellule pour ses synthèses (acides gras, stérols etc...) (12). Le dinucléotide phosphate n'intervient pas dans la chaîne respiratoire pour produire l'énergie sous forme d'A.T.P.

Cette voie de dégradation qui est importante dans la cellule hépatique, ne concerne que 15 % au plus du glucose utilisé dans le muscle et n'entre pas dans le cadre de notre étude puisqu'elle n'aboutit à aucun apport d'énergie.

5° - Régulation de la glycolyse

Toute la série des réactions glycolytiques se déroule sous la dépendance de phénomènes nerveux, hormonaux et chimiques. Les ions Mg^{++} qui jouent un rôle certain comme effecteurs d'enzymes, sont déplacés de leurs complexes protéiques par les ions Ca^{++} au moment de la contraction et ils peuvent ainsi exercer leur action dans ce sens tant que le calcium n'a pas regagné le reticulum sarcoplasmique après l'arrêt des salves d'influx nerveux.

L'adrénaline dont la sécrétion est réglée par la glycémie continue à être produite pendant le travail musculaire. Elle contribue ainsi à adapter la glycolyse aux besoins énergétiques. Elle agit sur les organes cibles que sont le foie et le muscle et son taux sérique ne s'abaisse que progressivement, permettant ainsi aux réactions glycolytiques de se maintenir quelques temps après l'arrêt de l'activité musculaire. Cette phase est indispensable à la relaxation musculaire qui a besoin d'A.T.P. pour s'établir (55).

Les équilibres chimiques participent eux-aussi à la régulation de la glycolyse. L'intervention des substrats essentiels tels que l'A.T.P., l'A.DP peut se faire soit en bout de chaîne de réactions, soit directement au niveau de la glycogénolyse comme c'est le cas pour la phosphorylation du fructose-6-phosphate.

Leur disparition ou leur concentration dans le milieu cellulaire orientent les réactions dans un sens ou dans l'autre.

Beaucoup d'inconnues subsistent encore au sujet des mécanismes des régulations métaboliques. Les schémas qui sont proposés reposent plus souvent sur des déductions que sur des preuves expérimentales formelles.

C - LA NOTION DE TYPES DE FIBRES MUSCULAIRES STRIEES

Comme nous venons de le voir, il existe deux grandes options pour la glycolyse dans les fibres musculaires :

. l'une est anaérobie et consomme beaucoup de glucose
. l'autre est aérobie et couplée à la chaîne respiratoire.

Cette dualité du catabolisme glucidique a été rapprochée de l'existence d'une certaine hétérogénéité morphologique des fibres dans les muscles squelettiques (cf. structure).

La question s'est alors posée de savoir si ces deux faits étaient liés. Pour la résoudre, de nombreuses recherches ont été entreprises, qui se sont attachées à préciser les critères de différenciation des fibres striées.

1° - *Les critères de différenciation des fibres*

La présence de deux sortes de fibres, les unes blanches, les autres rouges a été remarquée depuis déjà longtemps dans les muscles des Mammifères. Ces caractéristiques de couleur étaient liées à la taille, les fibres blanches étant plus volumineuses que les fibres rouges.

Puis, les moyens d'investigation se perfectionnant, une série de critères morphologiques vint s'ajouter aux différences de couleur et de taille, parmi ceux-ci étaient tenus pour essentiels :

- le diamètre des fibres
- la taille et la répartition des myofibrilles
- le contenu mitochondrial
- la forme du reticulum sarcoplasmique.

L'intérêt se porta ensuite sur des critères cytochimiques et physiologiques (14-15-17) dont les plus importants concernaient :

- l'activité A.TPasique des myofibrilles conduisant à deux types de fibres : les fibres I à faible activité et les fibres II à activité plus importante
- l'activité enzymatique des mitochondries
- le contenu en glycogène
- le contenu en triglycérides
- la rapidité et la durée de contraction faisant ressortir deux types de fibres : les fibres dites rapides qui se fatiguent plus vite que les fibres dites lentes.

Compte tenu de nos connaissances actuelles en matière d'activités enzymatiques dans la fibre musculaire, il semble que l'étude de la conformation du système mitochondrial suffise à elle seule à différencier les types de fibres chez les Mammifères (14).

Les critères retenus se rapportent à la taille, la forme, le nombre, la distribution, l'ultrastructure et l'activité des mitochondries.

Trois groupes ont été ainsi définis, individualisant :

. les fibres rouges,
. les fibres blanches,
. les fibres musculaires.

Des préparations cytochimiques qui révèlent la présence d'une enzyme de séquences métaboliques de la mitochondrie comme la succinodéshydrogénase par exemple, montrent clairement les différences entre ces 3 types, même en microscopie photonique (14).

2° - Les fibres rouges

Elles sont riches en sarcoplasme et pauvres en myofibrilles. Leur diamètre moyen est généralement le plus faible. Les mitochondries y sont très abondantes et disposées en couches sous le sarcolemme et entre les myofibrilles où elles sont alignées en chaînes. Les mitochondries présentent, le plus souvent, une forme plus ou moins sphérique, avec un volume important.

Dans la zone I, elles peuvent émettre des prolongements qui encerclent les myofibrilles. Les crêtes mitochondriales sont très développées et fortement tassées les unes contre les autres. C'est sur elles que sont localisés les sites enzymatiques des séquences du cycle de Krebs (32-29).

Ces fibres correspondent aux fibres dites lentes ou de type I possédant une haute activité oxydative. Il est vraisemblable que leur fatigabilité moindre s'explique par leur richesse en mitochondries d'une part, et en myoglobine d'autre part qui permettent le déroulement de la glycolyse aérobie.

3° - *Les fibres blanches*

Ce sont elles qui ont le diamètre le plus important. Le sarcoplasme est peu abondant comparé à la masse myofibrillaire. Les agrégats de mitochondries sous-sarcolemmiques sont, en général, inexistants. Les chaînes interfibrillaires sont inconstantes et pratiquement toutes les mitochondries sont regroupées dans la bande I ou quelquefois en position périnucléaire. Elles ont une forme filamenteuse et leur taille est réduite.

Les crêtes mitochondriales sont elles-mêmes peu développées et leur densité est faible.

Il est clair que ces fibres correspondant aux fibres dites rapides ou de type II, ont un équipement enzymatique qui ne convient pas à la glycolyse aérobie. Par contre, leur teneur relativement élevée en glycogène et le développement du réticulum sarcoplasmique plaident en faveur de la fermentation lactique et expliquent la fatigabilité plus grande de ces fibres.

4° - *Les fibres intermédiaires*

Elles sont intermédiaires aussi bien par la taille que par leur contenu en mitochondries. Ces dernières peuvent se trouver sous le sarcolemme, mais ce fait est assez rare ; généralement, elles sont situées

entre les myofibrilles, en chaînes comme dans les fibres rouges, tout en étant moins nombreuses et plus petites.

Les possibilités offertes pour le catabolisme glucidiques sont également mixtes.

5° - *Signification de l'hétérogénéité des fibres*

Les muscles squelettiques sont formés de fibres des trois types qui existent dans un rapport déterminé.

Ce rapport varie d'une masse musculaire à l'autre. La signification fonctionnelle de cette hétérogénéité n'est pas encore totalement établie.

Cependant, des études ont montré que les fibres rouges, réputées moins fatigables que les fibres blanches, sont surtout abondantes dans les muscles devant se contracter de façon continue et répétée (14).

La taille plus réduite de ces fibres permet des échanges rapides de gaz et de métabolites avec le milieu ambiant. En outre, le développement important des mitochondries entre les myofibrilles elles-mêmes, constitue un moyen de fournir instantanément l'énergie nécessaire à la contraction.

Malgré les inconnues qui subsistent quant à son déterminisme réel, l'hétérogénéité métabolique liée aux différences de structure des fibres est ainsi démontrée à l'intérieur des masses musculaires elles-mêmes.

Dans ce sens, il nous est apparu intéressant de rechercher la répartition des fibres dans un muscle relativement actif : le jumeau des Bovins, en localisant pour cela une enzyme spécifique de l'une ou de l'autre voie catabolique du glucose.

CHAPITRE TROISIEME

ETUDE DE LA LOCALISATION D'UNE ENZYME SPECIFIQUE DE LA MITOCHONDRIE : LA S.D.H.

A - *PRINCIPE ET CHOIX D'UNE ENZYME*

1° - Principe

Les deux orientations possibles de la glycolyse, l'une aboutissant à la formation d'acide lactique, l'autre se terminant par l'intégration au cycle de Krebs, répondent à l'hétérogénéité de structure des fibres musculaires ; L'équipement enzymatique, tributaire de la richesse relative en mitochondries permet de distinguer les 3 types de fibres ayant les unes un métabolisme glucidique surtout anaérobie, (type II) l'autre surtout aérobie (type I) enfin les intermédiaires avec un métabolisme mixte. Il paraît donc possible de reconnaître les fibres sur une préparation mettant en évidence une activité enzymatique spécifique de la mitochondrie.

2° - Choix d'une enzyme

Il existe de nombreuses enzymes mitochondriales. Notre choix s'est porté sur la succinodéshydrogénase ou S.D.H.

Il a été guidé par deux raisons essentielles :

- la première tient au fait que la succinodéshydrogénase est une des enzymes les mieux connues de la mitochondrie. Des études ont montré qu'elle était localisée et fortement fixée sur la face externe des crêtes mitochondriales à l'état de granules mesurant de 40 à 90 Å de diamètre (27-34).

- la deuxième raison tient à la facilité relative de mettre en évidence cette activité enzymatique à l'heure actuelle grâce à des colorations bien visibles en microscopie photonique.

B - TECHNIQUES DE LOCALISATION DE LA S.D.H.

1° - Principes généraux

Comme beaucoup d'enzymes, la succinodéshydrogénase est fragile et son activité décroît rapidement dans les tissus prélevés pour l'examen. La quasi-totalité des fixateurs la détruisent et seule la méthode de congélation rapide des échantillons de muscle assure une intégrité structurale et biochimique satisfaisante pour analyser les types de fibres.

La révélation de l'activité enzymatique se fait ensuite à partir de coupes sériées pratiquées dans ces fragments congelés.

La S.D.H. a un substrat spécifique représenté par l'acide succinique. Il est réduit en acide fumarique et les 2 atomes d'hydrogène enlevés sont transférés sur un accepteur qui est réduit.

In vivo, ce rôle est joué par la F.A.D, coenzyme solidement lié à la succinodéshydrogénase.

La recherche de l'activité enzymatique in vitro va donc se faire par l'incubation d'acide succinique en présence d'un accepteur d'hydrogène à un pH convenable. L'accepteur devra remplir un certain nombre de conditions indispensables :

- capter facilement l'hydrogène (potentiel d'oxydoréduction convenable)
- servir d'indicateur coloré
- indiquer le lieu précis de la réaction sans diffuser.

Pour cela, il devra être soluble à l'état oxydé et insoluble à l'état réduit. La réduction

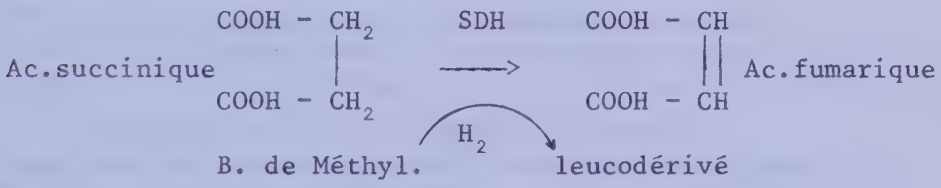
s'accompagnera d'une coloration la plus nette possible.

2° - *Etude critique des diverses techniques (7-32)*

Les difficultés rencontrées pour réunir ces trois qualités primordiales sur un même accepteur d'hydrogène expliquent la diversité des techniques proposées successivement.

- *La méthode au bleu de méthylène*

Elle fut utilisée pour la première fois par SEMENOFF en 1935. Il utilisait la transformation du bleu de méthylène oxydé en leucodérivé incolore par fixation de l'hydrogène de l'acide succinique.



Reprise par FOLLIS et BERTHRONG en 1949, cette méthode est aujourd'hui abandonnée car elle présente deux inconvénients majeurs.

- le leucodérivé est soluble, donc il risque de diffuser sur les coupes
- il risque de se produire une réoxydation rapide.

- *La méthode au tellurite de sodium*

Mise au point par WACHSTEIN, en 1949, elle nécessite une très longue incubation. La localisation du précipité de tellure de sodium étant peu précise par ailleurs, cette méthode est également abandonnée.

Toutes les méthodes modernes utilisent des sels de tétrazolium ; leur emploi est fonction des préparations étudiées et des résultats demandés.

D'une façon générale, ces sels fixent énergiquement l'hydrogène et la réaction est sensible. Les sels réduits:formazans ou diformazans sont bien colorés et donnent, le plus souvent, des précipités assez stables pour permettre une observation aisée. Les perfectionnements techniques s'attachent surtout à obtenir des précipités fins et insolubles. Toute une série de sels de tétrazolium ont été employés seuls ou associés à d'autres révélateurs. Nous avons classé les techniques correspondantes en trois rubriques principales basées sur l'intensité des réactions obtenues et la précision de leur lecture.

- Méthodes donnant une réaction faible

Elles utilisent le Bleu de tétrazolium selon la technique de SELIGMAN & RUTENBURG (1951). Le précipité obtenu est fin et peu abondant.

FARBER & LOUVIERE, en 1956, ont augmenté la sensibilité de la réaction en ajoutant un colorant d'oxydoréduction : le bleu de méthylène (32).

Ces méthodes conviennent pour les tissus à activité forte.

- Méthodes donnant une réaction intense

Elles utilisent soit le néotétrazolium (méthode de SHELTON & SCHNEIDER. 1952), soit l'iodonéotétrazolium (méthode de DEFENDI & PEARSON. 1955). Le précipité obtenu est grossier et la localisation est peu précise. Ces techniques sont employées pour des tissus à activité enzymatique faible.

- Méthodes de haute précision

Elles sont représentées par les techniques de PEARSE (1957) utilisant le méthyl-thiazol-tétrazolium et celles de NACHLAS et coll. (1957) réalisées à partir du nitro-bleu de tétrazolium.

Elles donnent toutes deux des réactions rapides, très sensibles avec des précipités très fins. Elles permettent donc de bien localiser les sites enzymatiques.

3° - Choix d'une technique

La technique employée devra être suffisamment sensible pour révéler à la fois les activités fortes des fibres du type I et celles des types II et intermédiaires.

La réduction devra être rapide pour éviter la dénaturation de l'enzyme tout en donnant un précipité assez fin et coloré.

Ces exigences ont fait retenir la méthode de NACHLAS et collaborateurs modifiée par KING-ENGEL et adaptée par FARDEAU (*1)

Cette technique utilise le nitro-bleu de tétrazolium selon des modalités qui seront décrites au paragraphe C.

---

*1 : Cette technique d'étude de la SDH fait partie d'une "batterie" de colorations et réactions histologiques, histochimiques et histoenzymologiques destinée à l'étude de la fibre musculaire striée squelettique normale et pathologique des Animaux domestiques.

Cette étude entreprise sous l'égide de l'INRA est réalisée par le Service d'Anatomie Pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Prof. G. VAN HAVERBEKE et P. CABANIE), avec la collaboration du Docteur M. FARDEAU (Division Rissler, Hôpital de la Salpêtrière).

C - PROTOCOLE EXPERIMENTAL (*2)

1° - Prélèvement des échantillons de muscles

Les échantillons sont prélevés sur le "jumeau" des bovins le plus rapidement possible après l'abattage des animaux.

Des petits fragments de muscle sont découpés (3.4 mm de côté) et immédiatement fixés du côté d'une section transversale sur des rondelles de liège (3 mm d'épaisseur environ), par une couche de gomme adragante.

2° - Congélation des échantillons

Dès que les prélèvements sont fixés sur les rondelles de liège, ils sont congelés par immersion dans l'isopentane porté à -120° environ. Cette température est obtenue en maintenant le bain d'isopentane dans l'azote liquide.

L'immersion du fragment de muscle est maintenue environ 10 secondes, puis on laisse flotter la rondelle de liège sur l'isopentane. Les échantillons sont ensuite placés pendant 12 heures dans un congélateur à -40°C.

Cette méthode permet d'obtenir des coupes fines d'une meilleure qualité que celles réalisées après congélation directe dans l'azote liquide.

(*2) : La réalisation technique de cette expérimentation est due à la compétence de Mme C. CASTAINGTS à qui nous adressons le témoignage de notre plus vive reconnaissance.

Les coupes transversales sont ensuite pratiquées au cryostat à -25°C, leur épaisseur varie entre 5 et 7µ.

Les coupes obtenues sont placées au réfrigérateur à +4°C pendant 24 heures pour permettre une meilleure adhérence des coupes sur les lamelles.

3° - *Mise en évidence de l'activité de la succino-déshydrogénase*

Après avoir séjourné 24 heures au réfrigérateur à +4°C les préparations sont mises à incuber pendant une heure environ dans le mélange suivant, préparé extemporanément et maintenu à 37°C.

- solution de succinate de sodium à 0.2M .... 5 ml
- tampon phosphate à 0.2 M ..... 5 ml

le pH de l'ensemble est ainsi amené à 7,4 environ. On ajoute, ensuite, 10 mg de nitro-bleu de tétrazolium.

Les deux solutions de succinate et de phosphate peuvent être préparées d'avance sous forme de solutions mères concentrées. Leur conservation au réfrigérateur est d'environ 3 semaines.

Après ce bain, les coupes subissent 3 ou 4 lavages successifs de 2 minutes chacun à l'aide d'eau distillée. Elles sont alors immédiatement montées à la gélatine-glycérinée.

Bien que ces coupes, conservées au frais et à l'obscurité, gardent leur coloration quelques temps, il vaut mieux les lire sans délai.

Le contrôle de la spécificité des réactions se fait à l'aide de coupes dans la préparation desquelles le succinate de sodium a été supprimé et l'activité succino-déshydrogénasique inhibée par l'iodoacétate.

D - RESULTATS : ETUDE DE LA REPARTITION DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES DANS LE MUSCLE JUMEAU DU BOVIN

Observées en microscopie photonique à un grossissement de 100, les préparations histoenzymologiques révèlent la présence de trois types de fibres qui se différencient par leur coloration. Les unes apparaissent foncées, avec une teinte bleu-violet homogène, et d'autres sont très claires plus ou moins orangées, enfin les fibres d'une troisième catégorie ont une couleur bleue surtout marquée à leur périphérie.

L'interprétation de ces coupes est évidente ; les fibres musculaires qui apparaissent en sombre, sont des fibres riches en succinodéshydrogénase, donc en mitochondries. Ce sont les fibres du type I, siège de la glycolyse presque exclusivement aérobie.

Les fibres claires sont celles du type II qui ne peuvent pratiquement dégrader le glucose que selon la voie anaérobie, enfin, les fibres légèrement bleues correspondent à celles des types intermédiaires. Le catabolisme glucidique y est mixte, selon un mode variable comme le suggèrent les différences d'intensité de coloration de ce type de fibres.

L'application de ces résultats à l'étude de la répartition des fibres des 3 types dans le muscle jumeau du Bovin appelle quelques remarques préliminaires :

- la proportion des fibres semble relativement variable d'un animal à l'autre ; mais le nombre des fibres blanches reste toujours le plus élevé dans ce muscle.

- les fibres blanches sont réputées avoir le diamètre le plus élevé ; il n'est cependant pas exceptionnel de rencontrer des fibres de type intermédiaire et parfois de type I ayant un diamètre supérieur.

Ceci montre l'intérêt des méthodes histoenzymologiques dans le typage des fibres musculaires.

Les observations que nous avons réalisées sur le muscle jumeau du Bovin permettent d'établir la répartition suivante :

. fibres de type I ..... 10-15 %
. fibres de type II ..... 65-75 %
. fibres intermédiaires ..... 15-20 %

Une des photographies obtenues à partir des préparations permet de mettre en évidence les différences de coloration existant entre les trois types de fibres (figure n° 11).

Ces quelques données sur une technique de réaction histoenzymologique appliquée au typage des fibres entrent dans le cadre d'une série de travaux entrepris sur la pathologie de la fibre musculaire des animaux domestiques.

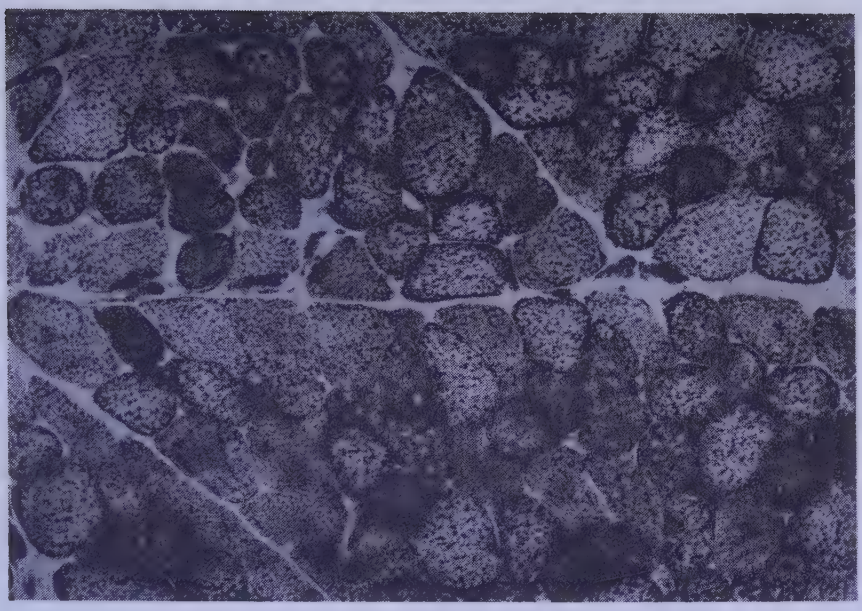


Figure 11.

Photographie d'une des préparations histoenzymologiques du muscle jumeau des bovins montrant les réactions des :

- fibres de type I à forte activité succinodéshydrogénasique (sombres) ;
- fibres de type II à activité faible (claires) ;
- fibres intermédiaires (grises).

CONCLUSION

Nous avons essayé de montrer dans ce travail de thèse, les relations existant entre le catabolisme glucidique et les particularités de l'organisation structurale de la fibre musculaire striée squelettique.

Au terme de cette étude, il apparaît qu'il existe trois grands types de fibres, caractérisés chacun par une orientation métabolique définie et correspondant à un équipement enzymatique particulier.

Leur mise en évidence par des méthodes histo-enzymologiques permet de préciser la répartition des fibres dans la masse musculaire normale. Il est permis de penser que ces données apporteront une contribution notable à la connaissance de la pathogénie de certaines myopathies.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

G. VAN HAVERBEKE

Vu : Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire

R. FLORIO

Vu Le Président de la Thèse

GUILHEM

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 19-5-72
LE PRESIDENT DE
L'UNIVERSITE PAUL SABATIER

L. LARENG

BIBLIOGRAPHIE

1. - ARCHER F. L. et KAO V. C. J.
Immuno-histochemical identification of actomyosin in myoepithelium of human tissue.
Lab. Invest. 1968, 18, 669-673.

2. - ARONSON J. F.
A melting point for the birefringent component of muscle.
J. Cell. Biol. 1966, 30, 453-464.

3. - AUBERT J.
La myofibrillogenèse du muscle strié. II. Vertébrés.
J. Microsc. 1969, 8, 367-390.

4. - BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P. et GUINNEBAULT M.
Biologie et physiologie cellulaire.
Edt. Herman Paris pp. 55-65 ; 109-127.

5. - BLOOM W. et FAWCETT D. W.
A textbook of histology.
Edt. W. B. Saunders Cie, (9e edition) p. 270-283.

6. - BRANDT P. W., LOPEZ E., REUBER J. P. et GRUNDFEST H.
The relationship between myofilament packing density and sarcomere length in frog striated muscle.
J. Cell. Biol. 1967, 33, 255-263.

6bis-CEDUS (documentation du) (30 rue Lübeck. Paris 16e)
Le muscle. Structure élémentaire, contraction énergétique.
n° 6. S. D.

7. - CULLING C. F. A.
Handbook of histopathological techniques.
Edt. Butterworth Londres, 1963, pp. 283-286.

8. - DREAMER D. W. et BASKIN R. J.
Ultrastructure of sarcoplasmic reticulum.
J. Cell. Biol. 1969, 42, 296-307.

9. - EZERMAN E.B. et ISHIKAWA H.
Differentiation of the sarcoplasmic reticulum and T system in developping chick skeletal muscle in vitro.
J. Cell. Biol. 1967, 35, 405-420.

10. - FAHIMI H. D. et KARNOVSKY M. J.
Cytochemical localization of two glycolytic deshydrogenase in white skeletal muscle.
J. Cell. Biol. 1966, 29, 113-128.

11. - FIRKET H.
Etude de l'ultrastructure de bourgeons musculaires en régénération pendant la myogenèse.
J. Microsc. 1963, 2, 639-642.

12. - FLORKIN M. et SCHOFFENIELS
Biochimie moléculaire.
Edt. Desoer, 1967, pp. 188-220 ; 274-290.

13. - FRANKE W. W. et SCHINKO W.
Nuclear shape in muscle cells.
J. Cell. Biol. 1969, 42, 326-331.

14. - GAUTHIER G. F. et PADYKULA H. A.
Cytological studies of fiber types in skeletal muscle. A comparative study of the mammalian diaphragme.
J. Cell. Biol. 1966, 28, 333-354.

15. - GERGELY J.
Biochemical aspects of muscular structure and fonction in Disorders of voluntary muscles.
Edt. Walton (2 édition) 1969, chap. 5, pp. 89-141.

16. - GOLDFISHER S.
The cytochemical localization of myoglobin in striated muscle of man and walrus.
J. Cell. Biol. 1967, 34, 398-403.

17. - GUTMANN E.
Basis muscle type differentiation. Exploratory concepts in muscular distrophy and related disorders.
Excerpta Medica Foundation 1966, 132-141 edt. by Milhorat. New-York.

18. - HASSELBACH W. et ELFIRN G.
Structural and chemical asymetry of the calcium transporting membranes of the sarcoplasmic reticular system as revelated by electron microscopy.
J. Ultrastructure Res. 1967, 17, 598-622.

19. - HEUSON-STIENNON J. A.
Etude des polysomes dans la synthèse des myofilaments du muscle embryonnaire du rat.
J. Microsc. 1964, 3, 229-232.

20. - HEUSON-STIENNON J. A. et DROCHMANS P.
Morphogenèse de la cellule musculaire striée étudiée au microscope électronique. II. Localisation et structure du glycogène.
J. Microsc. 1967, 6, 639-565.

21. - IKEMOTO N., KITAGAWA S., NAKAMURA A. et GERGELY J.
Electron microscopic investigations of actomyosin as a function of ionic strength.
J. Cell. Biol. 1968, 39, 620-629.

22. - ISHIKAWA H.
Formation of elaborate networks of T system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T. system formation.
J. Cell. Biol. 1968, 38, 51-58.

23. - ISHIKAWA H.
In vitro formation of elaboration networks of T system tubules in developping chick skeletal muscle.
J. Cell. Biol. 1967, 35.

24. - JAGENDORF - ELFVIN M.
Ultrastructure of the contraction relaxation cycle of glycerinated rabbit psoas muscle. II. The ultrastructure of glycerinated fibers related in EDTA and ATP following ATP induced contraction.
J. Ulstructure Res. 1967, 17, 379-

25. - JASPERS D. E.
Body muscle of the lamprey.
J. Cell. Biol. 1966 (brief notes) 219-226.

26. - KELLY D. E.
Fine structural analysis of muscle triad junctions.
J. Cell. Biol. 1967, 35, 66A-134.

27. - KELLY D.
Models of muscle Z band fine structure based on a looping filament configuration.
J. Cell. Biol. 1967, 34, 827.

28. - KNAPPEIS G. E. et CARLSEN F.
The ultrastructure of the Z-disc in skeletal muscle.
J. Cell. Biol. 1962, 13, 323.

28 bis-KNAPPEIS G. E. et CARLSEN F.
The ultrastructure of M line in skeletal muscle.
J. Cell. Biol. 1968, 38, 202-211.

29. - KERPEL-FRONIUS S. et HAJOS F.
The use of ferricyanide for the light and electron microscopic demonstration of succinic deshydrogenase activity.
Histochemie 1968, 14, 343-351.

30. - KROLENKO S. A.
Change in the T system of muscle fibers under the influence of influx and efflux of glycerol.
Nature, 1969, 221, 5184, 966-968.

31. - LANE B. P.
Localization of products of ATP hydrolysis in mammalian smooth muscle cells.
J. Cell Biol. 1967, 34, 713-720.

32. - LISON L.
Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes.
Edt. Gauthier-Villars Paris, 1960, Vol. I et II, pp. 266-272 ; 599-604 ; 767-768.

33. - MAGNAN C.
Traité de microscopie électronique.
Biocristallographie. Edt. Hermann, 1961, T.II, p.1178.

34. - MARTINEAU H. et PINSET-HARSTROM I.
Interactions spécifiques de l'actomyosine avec les ions Mg^{++} et Ca^{++} au microscope électronique.
J. Ultrastructure Res. 1969, 26, 251-261.

35. - MAUNSBACH A. B. et WIRSEN C.
Ultrastructural changes in kidney, myocardium an skeletal muscle of the dog during excessive mobilisation of free fatty acids.
J. Ultrastructure Res. 1966, 16, 35-54.

36. - MOREL F.
L'adénosine monophosphate cyclique, médiateur intracellulaire de l'action de nombreuses hormones.
Rev. triangle Vol. X. 1970.

37. - OGAWA K. et BARRNETT R. J.
Electron cytochemical studies of succinic deshydrogenase and dihydronicotinamide adenine dinucleotide diaphorase activities.
J. Ultrastructure Res. 1965, 12, 488-507.

38. - PADYKULA H. A. et GAUTHIER G. F.
The ultrastructure of neuromuscular junctions of mammalian red and white skeletal muscle fibers.
J. Cell. Biol. 1967, 35, 155A-322.

39. - PADYKULA H. A. et GAUTHIER G. F.
Morphological and cytochemical characteristics of fiber types in normal mammalian skeletal muscle. (Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders 1967).
Excerpta Med. Found. ICS 147, 117-131.

40. - PEASE D. C.
Structural features of unfixed mammalian smooth and striated muscle by glycol dehydration.
J. Ultrastructure Res. 1968, 23, 280-303.

41. - PEPE F. A.
Some aspects of the structural organisation of the myofibril as revealed by antibody staining methods.
J. Cell. Biol., 1967, 35, 915-935.

42. - PINSET-HÄRSTRÖM I.
Etudes de certaines propriétés de l'actomyosine en présence d'adénosine triphosphate à l'aide de la microscopie électronique.
J. Ultrastructure Res. 1967, 17, 273-281.

43. - PODOLSKY R. J.
Deposit formation in muscle fibers following contraction in presence of lead.
J. Cell. Biol. 1965, 25, 187-201.

44. - POLONOVSKY M.
Biochimie médicale. La cellule, les tissus, les organes, les humeurs, les sécrétions. Fasc. III.
Edit. 1961, 841-842.

45. - POLONOVSKY M.
Biochimie médicale. Fasc. I. Les constituants des organismes vivants.
Edit. 1970, 281-288.
Fasc. II. Enzymes et métabolismes, pp. 521.

46. - RASH J. E., SHAY J. W. et BIESELE J. J.
Urea extraction of Z bands intercalated disks and desmosomes.
J. Ultrastructure Res. 1968, 24, 181-196.

47. - ROSATI G.
Enzyme treatment of glycogen particles in rat liver and muscle.
J. Ultrastructure Res. 1967, 18, 444-466.

48. - ROSTGAARD J. et BEHNKE O.
Fine structural localization of adenine nucleoside phosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum of striated muscle.
Reprinted from Intracellular transport (pp.) Acad. Press, New-York. pp. 103-117.

49. - SANDBORN E. B., COTE M. G., ROBERGE J. et BOIS P.
Microtubules et filaments cytoplasmiques dans le muscle des mammifères.
J. Microsc. 1967, 6, 2, 169-178.

49 bis. SCHAEFFER C. W., VANDERBERG J. P. et RHODIN J.
The fine structure of mosquito midgut muscle.
J. Cell. Biol. 1968, 39, 405-411.

50. - SJOSTRAND F. S. et JAGENDORF-ELFVIN M.
Ultrastructure studies of the contraction-relaxation cycle of glycerinated rabbit psoas muscle. I. The ultrastructure of glycerinated fibers contracted by treatment with ATP.
J. Ultrastructure Res. 1967, 17, 348-378.

51. - SOMMER J. R. et HASSELBACH W.
The effect of glutaraldehyde and formaldehyde on the calcium pump of the sarcoplasmic reticulum.
J. Cell. Biol. 1967, 34, 902-905.

52. - SPIRO D. et HAGOPIAN M.
On the assemblage of the myofibrils.
Reprinted from "Symp. of the Int. Soc. for cell Biol. 1968, vol. 6, Acad. Press Inc. New-York.

53. - SPRIGGS T. L. B., LEVER J. D. et GRAHAM J. D. P.
Membrane connections at adrenergic terminals.
J. Microsc. 1967, 6, 425-430.

54. - STANLEY D. W. et Coll.
Mecanism of emptying of skeletal muscle cell segments.
J. Cell. Biol. 1968, 39, C1-C4.

55. - STROMER M. H., GOLL D. E., et ROTH L. E.
Morphology of rigor-shorterred bovine muscle and the effect of trypsin on pre and postrigor myofibrils.
J. Cell. Biol. 1967, 34, 431-445.

56. - STROMER M. H., HARTSHORNE D., HUBBARD H. et RICE R.
Removal and reconstitution of Z line material in a striated muscle.
J. Cell. Biol. 1968, 39, C 23- C 28.

57. - WALKER S. M. et SCHRODT G. R.
Triads in skeletal muscle fibers of 19 days fetal rats.
J. Cell. Biol. 1963, 37, 2, 564-569.

58. - WALKER S. M., SCHRODT G. R. et BINGHAM M.
Electron microscope study of the sarcoplasmic reticulum at the Z line level in skeletal muscle fibers of fetal and newborn rats.
J. Cell. Biol. 1968, 39, 2, 469-475.

59. - WANSON J. C. et DROCHMANS P.
Rabbit skeletal muscle glycogen. A morphological and biochemical study of glycogen B. particles isolated by the precipitation-centrifugation method.
J. Cell. Biol. 1968, 38, 1, 130-150.

60. - ZADUNAISKY J. A.
The localization of sodium in the transverse tubules of skeletal muscle.
J. Cell. Biol. 1967, C11-C16.

61. - ZOBEL C. R., BASKIN R. J. et WOLFE S. L.
Electron microscope observations on thick filaments isolated striated muscle.
J. Ultrastructure Res. 1967, 18, 637-650.